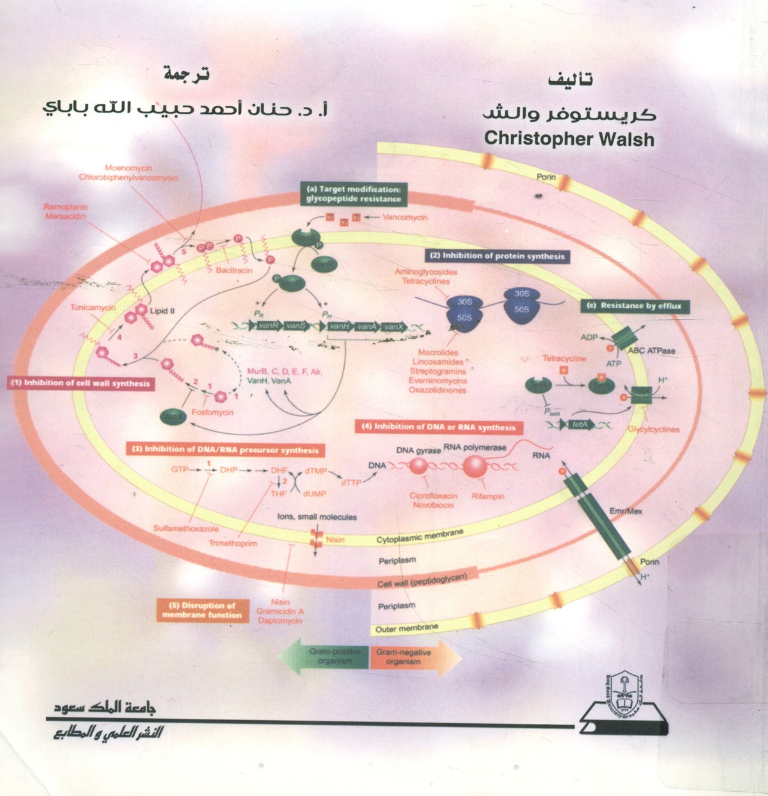
المضادات الحيوية ANTIBIOTICS

طرق العمل، المصادر، المقاومة
Actions, Origins , Resistance



تاليف
كريستوفر والش
Christopher Walsh

ترجمة
أ. د. حنان أحمد حبيب الله باباي

جامعة الملك سعود
النشر العلمي و المطابع



المضادات الحيوية

طرق العمل، المصادر، المقاومة

ANTIBIOTICS

Actions, Origins, Resistance

تأليف

كريستوفر والش

Christopher Walsh

كلية الطب جامعة هارفارد – بوسطن – مساتشوسيتس

ترجمة

أ.د. حنان أحمد حبيب الله باباي

استشارية الأحياء الطبية الدقيقة

مستشفى الملك خالد الجامعي – كلية الطب

جامعة الملك سعود



النشر العلمي والمطابع - جامعة الملك سعود

ص.ب ٦٨٩٥٣ - الرياض ١١٥٣٧ - المملكة العربية السعودية

هذه ترجمة عربية مصرح بها من مركز الترجمة بالجامعة لكتاب:

ANTIBIOTICS, ACTIONS, ORIGINS, RESISTANCE
By: Christopher Walsh
© 2003 ASM Press

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية أثناء النشر

والش، كريستوفر

المضادات الحيوية: طرق العمل، المصادر، المقاومة./ كريستوفر والش؛ حنان أحمد حبيب باباي.- الرياض، ١٤٣٣هـ

٣٩٦ ص ٢١×٢٨سم

ردمك: ٤-٩٣٨-٥٥-٩٩٦٠-٩٧٨

١- المضادات الحيوية ٢- الجراثيم أ. باباي، حنان أحمد حبيب (مترجم) ب. العنوان

ديوي ٥٧٤,١٩٢٤٦ ١٤٣٣/٤٠

رقم الإيداع: ١٤٣٣/٤٠

ردمك: ٤-٩٣٨-٥٥-٩٩٦٠-٩٧٨

حكمت هذا الكتاب لجنة متخصصة شكلها المجلس العلمي بالجامعة وقد وافق على نشره، بعد اطلاعه على تقارير المحكمين وذلك في اجتماعه العشرون للعام الدراسي ١٤٣١/ ١٤٣٢هـ المعقود بتاريخ ٢٤/ ٧/ ١٤٣٢هـ الموافق ٢٦/ ٦/ ٢٠١١م

النشر العلمي والمطابع، ١٤٣٣هـ

مقدمة المترجم

الحمد لله الذي جعل أول تنزيله الكريم قوله تعالى ﴿ ٱقْرَأْ ...① ﴾ العلق: الآية (١). آمراً بالعلم والتعلم، والصلاة والسلام على أفضل خلقه أجمعين محمد رسول الله الأمين وعلى آله وصحبه أجمعين. أما بعد فهذه ترجمة لكتاب "المضادات الحيوية، طرق العمل، مصادرها والمقاومة" التي تُوخي فيها الدقة في الترجمة لنقل كل ما رغب فيه المؤلف في نقله إلى قارئ الكتاب من الحقائق العلمية مهما كانت صغيرة.

ويعتبر هذا الكتاب مرجعاً مبسطاً يرجع إليه طلبة كليات الطب والصيدلة والكليات الصحية المهتمين بالمضادات الحيوية التي تستعمل في معالجة مختلف الأمراض المعدية التي تصيب الإنسان وطرق نشوء المقاومة لها. وللكتاب أيضاً أهمية لأعضاء هيئة التدريس والأطباء المختصين بمجال الصيدلة والأحياء الطبية الدقيقة حين الرجوع إلى المعلومات المكثفة والمختصرة الخاصة بمجال المضادات الحيوية ولاسيما بعد الازدياد الهائل في نشوء وتعدد المقاومة للمضادات الحيوية.

ولقد اعتمدنا بعد الله سبحانه وتعالى في ترجمة المفردات العلمية على المعجم الطبي الموحد الصادر من منظمة الصحة العالمية – المكتب الإقليمي لشرق المتوسط – الطبعة الرابعة.

وسنلاحظ كذلك بأن لبعض المفردات الإنجليزية أكثر من ترجمة. وفي هذه الحالة وضعنا كل ألفاظ الترجمات أولاً ثم بعد ذلك في سياق السرد رجعنا لأي من هذه الألفاظ، مثال ذلك كلمة (biosynthesis) والتي تترجم البناء الحيوي أو التكوين الحيوي، كلمة (pathways) وتترجم الطرق أو المسارات وكلمة (approach) تترجم أسلوب أو منهج. أما في الحالات النادرة والتي لم نجد فيها ترجمة المفردات العلمية والكيميائية أو اللغوية فقد رجعنا إلى المعاجم الأخرى مثل المورد لمنير البعلبكي الصادر عام ٢٠٠٢م أو قاموس حِتِي الطبي لعام ٢٠٠٠م. أما بعض المفردات وأسماء الإنزيمات والعمليات الكيميائية التي لم نجد لها ترجمة نهائياً في هذه المصادر فقد تمت كتابتها كما هي باللغة العربية والإنجليزية مثال كلمة (lantibiotic) فكتبت كما هي بالعربية (لانتيبيوتيك).

وإننا نود أن يكون هذا الكتاب بداية محفزة لإثراء المكتبة العربية بكتب مترجمة لهذا العلم الأساسي في مجال التعليم الطبي والممارسة السريرية، إذ إن عدد الكتب المعربة في مجال المضادات الحيوية والمقاومة لها لا زالت محدودة.

وفي الختام أود أن أتقدم بالشكر الجزيل والامتنان الخالص لزوجي الذي كان لدعمه الأثر البالغ في تحفيز وإنجاز هذا العمل، وكذلك والدتي وأبنائي لتهيئة البيئة المساعدة أثناء القيام بالعمل، وإلى كل من قام بتقديم النصح والمشورة الفنية.

ومن الله أرجو دوام التوفيق والسداد.

المترجمة

مقدمة المؤلف
PREFACE

لقد تطور هذا الكتاب نتيجة لأربعة اهتمامات متقاربة ومستمرة لفريقي البحثي: المثبطات الإنزيمية، وطرق التكوين الحيوي لجدار الخلية البكتيري، وآلية عمل المضادات الحيوية، وتطوير آليات المقاومة والتكوين الحيوي للبوليكيتيد، ومنتجات الببتيد الطبيعية غير الريبوسومية (polyketide and nonribosomal peptide natural products).

الافتراض الرئيسي للمنهجية المتبعة هو القدرة على فهم وتصنيف طريقة عمل المضاد الحيوي تاريخياً ومستقبلياً بواسطة تحليل كيفية التدخل الانتقائي لهذه الجزيئات الصغيرة في عملية واحدة أو أكثر من العملية المركزية لبقاء الخلايا البكتيرية. وغالبية التركيز في هذا الكتاب على المنتجات الطبيعية ذات النشاط كالمضاد الحيوي التي تنتجها المكروبات لتعمل كأسلحة كيميائية على البكتيريا المجاورة، وفُحصت كذلك المواد الكيميائية المُصنعة ذات النشاط كالمضادات الحيوية. توجد تقارير عن الآلاف من الجزيئات ذات النشاط كالمضاد الحيوي ولكن القليل فقط من الأصناف التركيبية لها تأثير على الأمراض المعدية البشرية. ويركز هذا الكتاب على هذه الأصناف من المضادات الحيوية.

إن هذا الكتاب لا يُعنى بأن يكون موسوعياً، ولا كتاب معلومات صيدلانية، ولا لدراسة العوامل الميكروبيولوجية المسببة للأمراض وكيفية معالجتها. توجد نصوص وكتب مرجعية تهتم بالجوانب الخاصة بالعوامل المضادة للمكروبات.

تعمل الأصناف الرئيسة الحالية من المضادات الحيوية على مجموعة أهداف فرعية: التكوين الحيوي لجدار الخلية البكتيري، تكوين البروتين البكتيري، وتكرار وإصلاح دنا (DNA)، التكوين الحيوي للثيميدين بواسطة مسار الفوليت المعتمد على الإنزيم المساعد. ويفحص الباب الأول من الكتاب كيفية عرقلة المضادات الحيوية للبروتينات المعينة التي تعمل في هذه العمليات البكتيرية الأساسية وكيف يساعد التركيب الجزيئي للأدوية صغيرة – الجزيئات على نشاطها المضاد الحيوي.

يهتم الباب الثاني للكتاب بتطور المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية، بدءاً بالمنطق الجزيئي بأن المكروبات المنتجة للمضادات الحيوية تستعمل طرق معيَّنة للحماية الذاتية. الطرق الثلاث الرئيسة للمقاومة في منتجات

المضادات الحيوية هي تدمير المضادات الحيوية، الإخراج النشط للمضادات الحيوية بواسطة مضخات - خلال الأغشية، وتعديل تراكيب الهدف مما يؤدي إلى عدم الاستجابة للمضادات الحيوية. هذه الطرق تعتبر آليات رئيسة للمقاومة في البكتيريا المسببة للأمراض.

ويهتم الباب الثالث من النص بالمنطق الجزيئي للتكوين الحيوي، بدءاً بالشبكات المنظمة التي تتحكم في نسخة الجين للاستقلاب الثانوي في المتسلسلات (streptomycetes)، التي تنتج المضادات الحيوية. تُصنع مضادات البوليكيتيد والمضادات الحيوية غير الريبوسومية على "خطوط تجميع متعددة الجزيئات" مشابهة لماكينة الإنزيم المصنع للأحماض الدهنية (acid synthase machinery fatty). وتُمكن إستراتيجية خط التجميع المثالية من التباين الواسع في تركيب هذه الأصناف من العوامل المضادة للبكتيريا وكذلك توفر فرصة التكوين الحيوي الاندماجي الموجَه.

يبحث الباب الأخير من الكتاب آفاق توسيع قاعدة الأهداف البكتيرية وكذلك المضادات الحيوية الجديدة المرجح بروزها إلى الوجود. لقد نقل تسلسل المجين البكتيري البحوث الخاصة بالمضادات البكتيرية من عصر الفقر - في الهدف إلى عصر الغنى - في الهدف. ومن المحتمل أن تظهر مضادات حيوية جديدة من كل من الجهود الكيميائية الاصطناعية، وربما عن طريق الجهود الكيميائية الاندماجية، وأيضا من المنتجات الطبيعية بواسطة مغايرات التكوين الحيوي الاندماجية.

أنا ممتن إلى العديد من أعضاء فريقي البحثي، وبالأخص خلال السنوات الخمس الماضية، للكثير من المناقشات والأفكار الخاصة بعمل المضادات الحيوية، والتكوين الحيوي المقاومة.

أشكر جون تروجر (John Trauger) لتصميم وإنجاز العمل الفني على الأهداف في الخلايا البكتيرية التي أدت إلى فن غلاف الكتاب والرسومات في مقدمة الفصول. وأشكر غاري مارشال (Gary Marshall)، وريموند تشين (Raymond Chen)، وهيتين باتيل (Hiten Patel)، وستيف برونر (Steve Bruner)، ومايك بوركارت (Mike Burkart)، وسوزان كلوجستون (Susan Clugston)، ورائول كوهلي (Rahul Kohli)، وهيذر لوسي (Heather Losey)، ولوسونج لو (Lusong Luo) لإسهاماتهم العديدة في إنشاء الأعمال الفنية وتصميمها وتنفيذها وكذلك لتصحيح العديد من التناقضات والأخطاء طوال فترة العمل. أقر مساعدة ومساهمة تانيا شنيدر (Tanya Schneider)، وسارة أوكونور (Sarah O'Connor)، وبالأخص لوسونج لو (Lusong Luo) على الجهود المبذولة لمقتبسات الأدب. وأتوجه بالشكر الخاص إلى غاري مارشال للاجتهاد الهائل والاهتمام بالنص وخاصة الجزء الأكبر من الأعمال الفنية النهائية للكتاب.

كريستوفر والش

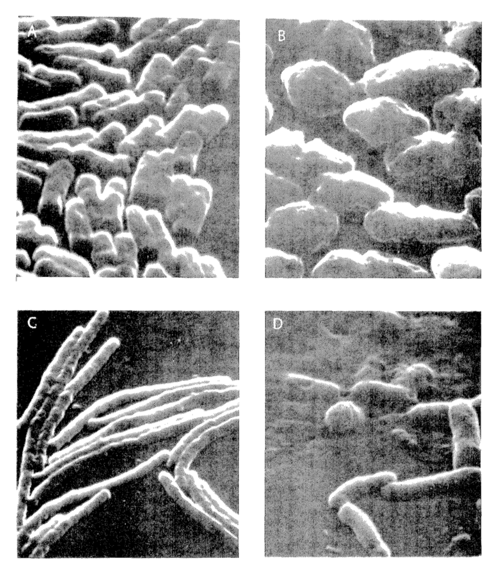
يناير ٢٠٠٣

المحتويات
Contents



مقدمة إلى المضادّات الحيوية
INTRODUCTION TO ANTIBIOTICS

في هذا الباب التمهيدي حُدِّد مجال وهدف الكتاب، مع التركيز على المضادّات الحيوية من المصادر الطبيعية والاصطناعية التي لها دور كبير في معالجة الأمراض البكتيرية التي تصيب الإنسان. أُوضِحت مصادر المضادّات الحيوية الطبيعية جنباً إلى جنب مع إستراتيجيات الوقاية الذاتية في الكائنات المُنتِجة وتَطَور المقاومة في البكتيريا التي سبق وكانت حساسة. إن التَطوُّر المحتوم للبكتيريا التي تعرضت للمضادّات الحيوية لتصبح مقَاومة يضمن الحاجة لدورات مستمرة من الاكتشاف وتطوير مضادّات حيوية جديدة.



أثر مضادّات البيتالكتام (β-lactam) الحيوية على الخلايا البكتيرية. (A) خلايا الاشريكية القولونية *(Escherichia coli)* العصوية الشكل غير المعالجة، (B – D) الخلايا بعد المعالجة بمختلف مضادّات البيتالكتام الحيوية، تُظهر حطام متحلل، آفات جدار وسطية، والكورات (بكتيريا عديمة الغلاف) (spheroplast). (الأشكال أ–ج مأخوذة بالإذن من جرينوود و أوجريدي (Greenwood and O'Grady ,1973) والشكل د– من جرينوود و أوجريدي 1969).

الفصل الأول

المضادّات الحيوية: المفاهيم الأولية
ANTIBIOTICS: INITIAL CONCEPTS

ما هي المضادّات الحيوية ومن أين أتت؟

المضادّات الحيوية هي الجزيئات التي توقف نمو المكروبات سواءٌ أكانت بكتيريا أم فطريات وتقتلها مباشرة. كما هو موضح في الشكل (١.١)، المضادّات الحيوية التي تمنع البكتيريا من النمو هي كابحة للبكتيريا (bacteriostatic)، مثل عقارالكلورامفينيكول (chloramphenicol). المضادّات الحيوية التي تسبب موت الخلية البكتيرية هي مبيدة للبكتيريا (bactericidal)، تقلّل العدد البكتيري، كما هو الحال في البنسيلّين. وقد تُظهر بعض المضادّات الحيوية نشاط مثبط للبكتيريا في بعض الظروف ونشاط مبيد للبكتيريا في أخرى حيث يحدث تدمير كافٍ لواحد أو أكثر من تراكيب أو سبل الخلية مما يحفز ناتج استجابة مبيدة للبكتيريا.

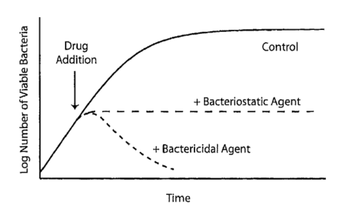
المضادّات الحيوية هي عوامل "ضد الحياة" "against life" قد تكون منتجات طبيعية أو من صنع الإنسان من المواد الكيميائية الاصطناعية، صُمِّمت لعرقلة بعض العمليات المهمة بشكل انتقائي في الخلايا الجرثومية. معظم المضادّات الحيوية التي أُدخلت للاستعمال السريري للإنسان لعلاج المرض المعدي في السنوات الستين الماضية كانت منتجات طبيعية، وأُنتجت بواسطة كائن دقيق واحد في موطن معين وتحت ظروف بيئية معينة وهي تؤثر على المكروبات المجاورة، إما بتنظيم نموها أو بداية القضاء عليها. تُنْتَج منتجات المضادّات الحيوية الطبيعية بواسطة كل من البكتيريا والفطريات، والمجموعة الرئيسة من البكتيريا المنتجة للمضادّات الحيوية هي الفطريات الشعية (Actinomycetes). كما أن الأدوية المضادة للجراثيم يمكن أن تكون مضادة للبكتيريا أو مضادة للفطريات. ولا توجد عوامل علاجية مضادة للبكتيريا ومضادة للفطريات على حد سواء، وذلك بسبب اختلاف الأهداف الجزيئية والخلوية والقضايا المتعلقة باختراق الخلية الجرثومية. وسيكون تركيز هذا الكتاب على العوامل المضادّة للبكتيريا فقط، ويرجع ذلك جزئياً إلى العدد الكبير وتنوع الأدوية العلاجية المضادة للبكتيريا، وزيادة معدل

العداوى (الإنْتانات) البكتيرية المسبِّبة للأمراض، وأخيراً عدم وجود مساحة لتغطية جميع المواضيع على نحو كاف في مجلد واحد.

في حين أن معظم الأصناف العلاجية من المضادّات الحيوية المستعملة هي منتجات طبيعية أو مشتقات شبه اصطناعية، كما سنلاحظ في الفصل الثاني، إلاَ أن هناك ثلاثة أصناف من المضادّات الحيوية الاصطناعية في الاستعمال السريري هي من صنع الإنسان. أُدخلت عقاقير السلفا (sulfa) في الثلاثينيات، وعقاقير كوينولونات (quinolones) في الستينيات وتمت إجازة أوكسازوليدينون (oxazolidinone) في الولايات المتحدة الأمريكية في عام ٢٠٠٠. وسندرس اكتشافها وتطويرها بالتوازي مع المضادّات الحيوية الطبيعية. إن الغرض من مصدر المضادّات الحيوية الإصطناعية واضح: فهي تنبع من برامج كيمياء دوائية / مرض عدوائي في مختبرات البحوث في مجال صناعة الأدوية.

الوجود والتّطوُّر السريري لكل من منتجات المضادّات الحيوية الطبيعية والاصطناعية يعكس التفرُّع في برامج اكتشاف المضادّات الحيوية في القرن العشرين. فمن جانب واحد كان اتجاه الكيمياء الدوائية التي تتبع نهج "الرصاصة السحرية" الكلاسيكي وهو يهدف لصنع مركبات نقية ذات خواص محدّدة وفائدة علاجية. هذا النهج قد حقق انتصارا من قبل بإدخال عقاقير السلفا كمضادّات للبكتيريا، والتي ما زالت تستعمل بعد ست عقود (أميز، Amyes, 2001). ومن مسار منفصل جاء عزل البنسيلّين، المنتَج الطبيعي، بوصفه عاملاً فعالاً مضاداً للبكتيريا. وأدى ذلك إلى الاعتراف بأن المكروبات تشن حرباً ضد بعضها بعضاً بالمضادّات الحيوية، لتبدأ من ذلك عقود من المسح المكثف للمزارع الجُرثومية للبحث عن أصناف جديدة من المضادّات الحيوية والتي أدت إلى الاكتشاف والتّطوُّرالسريري لأنواع البنسيلّين (penicillins)، والكيفالوسبورين (cephalosporins)، التراسيكلين (tetracyclins)، ستربتوميسين (streptomycins) والأجيال الأخيرة من الامينوغليكوسيدات (aminoglycosides)، كلورامفينيكول (chloramphenicol)، ريفاميسينات (rifamycins)، غليكوبيبتيدات (glycopeptides)، ومن مضادّات الميكروليد (macrolide) الحيوية، صنف الإريثروميسين (erythromycin).

أدى اكتشاف النموذجين من المضادّات الحيوية، وهما السلفا صناعياً والبنسيلّين طبيعياً إلى التقارب مع إدخال الأجيال الأخيرة من المتغيرات الشبه اصطناعية من كل من مضادّات البيتالاكتام (β-lactam) وميكروليد، حيث استخدمت الكيمياء في هندسة بعض الصفات المنشودة، مثل التوافر الحيوي (bioavailability)، الثبات (stability)، النطاق (المدى) الأوسع من النشاط (broader spectrum of activity)، أو الفعاليّة ضد المكروبات المقاومة.



الشكل (١,١). آثار المضادّات الحيوية المثبطة للبكتيريا مقابل المضادّات الحيوية المبيدة للبكتيريا على المزرعة البكتيرية ذات النمو اللوغاريثمي (logarithmically). (بالإذن من شولار و برات (Scholar and Pratt، 2000).

كشفت الأصناف المختلفة من المضادّات الحيوية عن أهداف واضحة في البكتيريا

إن توفُّر التراكيب المختلفة من أصناف المضادّات الحيوية الاصطناعية والطبيعية وشبه الاصطناعية سمح بتحديد الأهداف المثبطة والمبيدة للبكتيريا (انظر جيل Gale, 1981)، رسل وشبرا (Russell and Chopra, 1996)، كما سنتناول في الفصل التالي مزيداً من التفاصيل. وعندما تم الكشف عن جزيء مضاد حيوي جديد في مزرعة أو مرق (broth) مكروبي أو بالمسح في برنامج الكيمياء الدوائية الاصطناعية، كان من الممكن مقارنته ضد المضادّات الحيوية المعيارية ذات آليات العمل المعروفة. وتقترح الآلية الجديدة الهدف الجديد الذي يمكن أن يُرسم من خلال التحليل الكيميائي الحيوي. ومن جانب آخر فإن معرفة الأهداف وآليات العمل للأصناف الرئيسة للأدوية المضادة للمكروبات قد وفَّر مجموعة من الفحوص التي من شأنها السماح بتصنيف المضادّات الميكروبية المكتشفة حديثاً من جانب آليات العمل، مثال: ضد البناء (التكوين) الحيوي لجدار الخلية أو كمثبطات لبناء البروتين الحيوي.

إن تقييم جزيئات جديدة من المضادّات البكتيرية عادة ما يتبع إجراءات رئيسة. أولاً، تُختبر المركبات الجديدة ضد فريق من السلالات البكتيرية، وكثير منها هي من العوامل البكتيرية المسبِّبة للأمراض الناجمة من العزل السريري، وتمتلك العديد من هذه مقاومة مسبقة للأجيال السابقة من المضادّات الحيوية. وإذا أظهر المضاد الحيوي الجديد المرشح فعاليّة كافية ضد السلالات المُوسَمة فإنه يمكن تقييم الجزيء في الحيوانات الملقّحة للحصول على مستويات عالية من العداوى بسلالات محددة من البكتيريا في أنسجة محددة (مثل: عداوى الدم البكتيرية، أو تجرثم الدم) لمعرفة ما إذا كان المرشح هو جزيء وقائي و/أو علاجي. وبعد ذلك يمكن مقارنة المضاد الحيوي الجديد ضد المضادّات الحيوية المعيارية المستخدمة ضد العداوى البكتيرية، مع كل من السلالات من المُمرضات الحساسة والمقاومة للمضاد الحيوي. وإذا تم نجاح الجزيء الجديد في هذه الاختبارات، فمن الممكن أن يكون في طريقه كمرشح للتطوير.

متى تَصنع المكروبات المضادّات الحيوية وكيف تُدبِّر الحماية الذاتية؟

المنتجات الطبيعية ذات نشاط المضاد الحيوي تكاد تكون جميعها منتجات من مسارات الأيض (الاستقلاب) الثانوية، وهي مسارات من الممكن الاستغناء عنها تحت العديد من ظروف النمو وهي منتجات ثانوية للمسارات الأولية المطلوبة للبقاء على قيد الحياة في عندما تكون الكائنات الدقيقة في مراحل النمو النشط. ولكن عندما تدخل المكروبات التي تنتج المضادّات الحيوية المرحلة المستقرة (stationary phase) وتواجه المنافسة على المكان و/أو الغذاء لكائنات أخرى، فإنها تُشغِّل الجينات التي تشفِّر جزيء المضاد الحيوي وتستخدمه في تنظيم النمو، أو ربما أو بنشاط أكثر تشن حرباً كيميائية على جيرانها. ثم تكون لمنتجي المضادّات الحيوية الأفضلية الانتقائية (selective advantage) من أجل النمو بما في ذلك الحصول على المواد الغذائية من جيرانها المحتضرين، وسيكون لها الضغط الإنتقائي (selective pressure) للحفاظ على السبل (الطرق) المنتجة للمضاد الحيوي وتُشغِّلها في أوقات الحاجة. وسوف نفحص الإشارات وآليات الاتصال بين استشعار النصاب (quorum sensing) وداخل البكتيريا (المسارات التنظيمية ذات - الشقيْن) (two-component regulatory pathways) المعروفة بدورها في تشغيل مسارات المضادّات الحيوية.

تحتاج البكتيريا والفطريات التي تصنع المضادّات الحيوية إلى الحماية الذاتية أو آليات المناعة الذاتية من الأسلحة الكيميائية القاتلة التي تنتجها فهي تستخدم مجموعة متنوعة من الإستراتيجيات، كما سنلاحظ بالتفصيل في الفصل السابع. والعامل المشترك بينها هو تصدير النُظُم بالتبادل للمضاد الحيوي الناضج من الخلية المنتجة إلى الوسط الخارجي لإبقاء التراكيز منخفضة في الكائنات المُنتجة. بعض المضادّات الحيوية مثل الامينوغليكوسيد، ستربتوميسين و ميكروليد أولياندوميسين (oleandomycin) يتم تصديرها رغم أنهما لا يزالا غير نشطين وعلى بعد خطوات عديدةٍ من النضج الإنزيمي القاتل، الذي يحدث خارج الخلية. ويغير منتجي المضادّات الحيوية الآخرين تركيب جدران الخلية الخاص بهم، كما يعدِل عنصر ببتتديل ترانسفيراز (إنزيم ناقلة الببتيديل) (peptidyltransferase) المستخدم في آلية تكوين البروتين على الريبوسومات البكتيرية، أو يُحدث تطفرات لتقليل الحساسية التركيبية في إنزيمات تكرار الحمض النووي دنا (DNA) لتوفير الحماية ضد التدمير - الذاتي. وهناك جدل بخصوص أن آليات الحماية الذاتية قد تكون ظهرت بالمشاركة مع سبل التكوين الحيوي للمضاد الحيوي، وأن الحماية الذاتية وجينات التكوين الحيوي للمضاد الحيوي تكون في كثير من الأحيان مجتمعة ومنتظمة سوياً.

كيف تتطوّر المقاومة؟

في مئات الملايين من السنوات التي كانت فيها بعض فروع البكتيريا والفطريات تنتج المضادّات الحيوية لتعمل على جيرانها، كان الضغط التَطوُّري يعمل في البكتيريا التي تحت الهجوم لوضع آليات المقاومة للبقاء على قيد الحياة. وفي السبعين عاماً من عصر المضادّات الحيوية المستخدمة في علاج الإنسان من الأمراض المعدية، تطوّرت

البكتيريا بشكل مناظر بدون كلل مع اكتسابها مقاومة سريرية مؤثرة للصنف تلو الآخر من المضادّات الحيوية (أميز Amyes, 2001 ، ليفي Levy, 1998). ساعد على تَطوُّر الطفرات (mutants) وجود العدد الكبير من الخلايا البكتيرية في السكان مع الأزمنة القصيرة للتولُّد (short generation times). قد تنتج آلية تكرار الحمض النووي البكتيري دنا (DNA) خطأً واحد في ١٠^٧ ، في تكرار المجين ٣×١٠^٦ — bp الذي يحتوي على ٣٠٠٠ جين، أي ٠,٣ خطأً في كل جيل. وإذا كان هناك ١٠^١١ بكتيريا في السكان مثال ذلك في المريض الذي تمت معالجته من العدوى البكتيرية الجهازية المتولّدة من الدم، فقد يكون هناك ١٠٠٠ طفرات متغايرة وإذا كانت الطفرات موزعة بشكل عشوائي خلال المجين البكتيري فإن ١٠٠٠ جين، واحد من ثلاثة سيكون له طفرة واحدة. وإذا منح واحد من هذه الميزة الانتقائية من أجل البقاء، على سبيل المثال في وجود أحد المضادّات الحيوية، فإنه سيتم انتقاء البكتيريا المقاومة لتنمو وتأخذ طريقها في الاستنبات في حين يموت جيرانها. ويمكن أن يحدث ذلك في غضون أيام في المرضى الذين يُعالَجون بالمضادّات الحيوية. ومن هذا المنطق فإنه من المحتمل جداً أن تتطوّر المقاومة في الجمهرة البكتيرية وكلما اتّسع نطاق استعمال المضادّات الحيوية، كان احتمال المقاومة أكثر ما لم يكن هناك حاجة لطفرات متعدِّدة. كما هو ملاحظ في الجدول (١,١)، فمنذ إدخال مضادّات السلفونامايد الحيوية في الثلاثينيات، ومن خلال الكيفالوسبورين والبنسيلّين الشبه اصطناعي في الستينيات، تبع ذلك في وقت لاحق من عقد إلى ثلاثة عقود ظهور المقاومة السريرية الخطيرة للمضادّات الحيوية. والناس في الولايات المتحدة يملؤون حوالي ٨٠ مليون وصفة للمضادّات الحيوية سنويا، والتي تشمل حوالي ١٢٥٠٠ طن من الأدوية في السنة. وفي ما يقارب الخمسين عاماً من عصر المضادّات الحيوية، تم إنتاج وتوزيع ما يقارب خمسين مليون طن من المضادّات الحيوية، ويشمل ذلك للاستخدام الحيواني والزراعي، مما يوحي إلى وجود مستودع مهم لنشوء المقاومة البكتيرية.

المتطلب الثاني وراء احتمال الانتقاء الإحصائي للمقاومة البكتيرية للمضادّات الحيوية هو توافر الآليات. وسنلاحظ في المنتجات الطبيعية من المضادّات الحيوية، أن معظم آليات المقاومة المختلفة في البكتيرية المُمرضة التي تسبب الأمراض في الإنسان يبدو أنها قد اكتُسبت من المُحددات وآليات المقاومة من البكتيريا – المنتجة للمضادّات الحيوية. وقد تم اكتساب أداة الحماية الذاتية لمنتجي المضادّات الحيوية من العوامل المسبِّبة للأمراض تحت ضغط أن تتكيف أو أن تموت. وإحدى المميزات الكامنة للمضادّات البكتيرية الاصطناعية هو أنها لم تكن بالفعل في المحيط الحيوي وهكذا قد لا يكون هناك مستودعات من آليات المقاومة الداخلية التي يمكن اكتسابها بسرعة بواسطة المُمْرضات المستهدفة. ومع ذلك، فإن الإنزيمات الموجودة قد خضعت لجولات من الطفرة التي تؤدي إلى مقاومة السلفوناميد والترايميثوبريم (trimethoprim) (انظر الفصل السادس). وعلى سبيل المثال، تعتبر آليات التدفق (efflux mechanisms) مهمة في إبطال أدوية الكوينولون (quinolone) المضادة للبكتيريا.

الجدول (١,١). ظهور المقاومة للمضادّات الحيوية.

المضاد الحيوي	سنة الظهور	ملاحظة المقاومة
سلفوناميد Sulfonamides	١٩٣٠s (في الثلاثينيات)	١٩٤٠s (في الأربعينيات)
البنسيلّين Penicillin	١٩٤٣	١٩٤٦
ستربتوميسين treptomycin	١٩٤٣	١٩٥٩
كلورامفينيكول Chloramphenicol	١٩٤٧	١٩٥٩
تتراسيكلين Tetracycline	١٩٤٨	١٩٥٣
إريثروميسين Erythromycin	١٩٥٢	١٩٨٨
فانكوميسين Vancomycin	١٩٥٦	١٩٨٨
مثيسيلين Methicillin	١٩٦٠	١٩٦١
امبيسيلين Ampicillin	١٩٦١	١٩٧٣
كيفالوسبورين Cephalosporins	١٩٦٠s (في الستينيات)	١٩٦٠s (أواخر الستينيات)

من بالومبي (Palumbi) (2001)، مع الإذن.

استمرار الحاجة إلى المضادّات الحيوية الجديدة: من أين ستأتي؟

إن تجربة الأمراض المعدية منتصف القرن الماضي هي أن إدخال صنف جديد من المضادّات الحيوية، إذا كانت فعالة وآمنة، سيؤدي إلى الاستخدام الواسع النطاق ومن ثمّ إلى تَطوُّر المقاومة للأسباب الجزيئية المذكورة أعلاه (شُرحت في الفصل السابع عشر). وللتغلب على مثل هذه المقاومة، استخدم علماء الكيمياء العلاجيين المُمْرِضات المقاومة كأهداف لاختبار التعديلات على المضادّات الحيوية الحالية لتوسيع نطاق عمل الجزيئات التي استعادت الفعاليّة ضد المكروبات المقاومة. ومن بين مضادّات بيتالاكتام الحيوية، نتجت تكرارات متعدِّدة لتراكيب البنسيلّين وإلى أربعة أجيال من الكيفالوسبورين، تمثل كل منها تعديلات كيميائية أُدخلت إما لتوسيع نطاق عملها أو للتغلب على انتشار المقاومة. من بين مضادّات ميكروليد الحيوية، أُتبع الإرثروميسين بالعوامل واسعة المدى، أزيثروميسين وكلاريثروميسين وكيتولايدات (azithromycin and clarithromycin and the ketolides)، والعوامل واسعة المدى التي دخلت للسوق حديثاً. هذه الأمثلة هي المنتجات من ترقيع التراكيب الطبيعية للمضادّات الحيوية للتغيير التدريجي.

والطريق الثاني لعرض التحدي (بالومبي 2001, Palumbi) هو أن ننظر لسيل المضادّات الحيوية التي تستخدم لعلاج العداوى المكوراتية العنقودية (staphylococcal infections) على مدى نصف القرن الماضي (الشكل ١,٢). فقد كان للبنسيلّين فعاليّة عامة منذ إدخاله عام ١٩٤٦. وبحلول عام ١٩٦١ أُدخل الأمبيسيلين (ampicillin) الشبه اصطناعي للتعامل مع النشاط الإنزيمي للبيتالاكتاماز (β-lactamase) في العداوى المكوراتية العنقودية. وبالنسبة للمكورات العنقودية المقاومة للمشيلين (methicillin resistant Staphylococcus aureus) (إم آر إس إيه MRSA) كان الفانكوميسين

(vancomycin) هو الدواء المختار في عام ١٩٨٦. وتستمر القصة، حيث أدخل في عام ١٩٩٩ أوكسازوليدونون لينيزوليد (زيفوكس) (oxazoldinone linezolid (zyvox، وأظهر مؤشرات نشاط ضد المكورات العنقودية المتعدِّدة المقاومة.

توجد وسيلتان من الوسائل المعاصرة الموازية لتحديد الجزيئات الجديدة النشطة ضد البكتيريا المقاومة والمسبِّبة للأمراض وهي الاستمرار في البحث عن المضادّات الحيوية في المرق الجرثومي وتنمية مكتبات اصطناعية كبيرة من الطرق الكيميائية الاندماجية وبعد ستة عقود من الفحص المكثف قد يكون هناك تناقص عائد للفحص التقليدي ولكن من الممكن تحسين ذلك ببذل المزيد من الجهود لإيجاد جينات جديدة للتكوين الحيوي للمضادّات الحيوية من الجزء الأكبر من المكروبات التي لم يتم تزريعها وطرق للتكوين الحيوي الاندماجي للمضادّات الحيوية للحصول على تراكيب جديدة من المضادّات الحيوية الطبيعية. وكلا الطريقتين بنيتا على الملاحظات أن العديد من الجينات التي ترمِّز (تُشفِّر) سبل الاستقلاب للمضادّات الحيوية تتجمع سوياً، وبذلك يمكن استنساخها ومعالجتها كوحدات متجاورة من الحمض النووي دنا (DNA). وما تزال المكتبات الكيميائية الاصطناعية في التوسع مع الزيادة في المجموعة الوظيفية والتعقيد المعماري، وكما أنه من الممكن أن تصبح المصدر الرئيسي لاكتشاف منصات هيكلية جديدة التي يمكن أن تكون الأمثل.

Penicillin 1946

Methicillin 1961

Vancomycin 1986

Zyvox 1999

الشكل (١,٢). التقدم في المضادّات الحيوية المطلوبة للكفاءة في العداوى المكوراتية العنقودية (مقتبسة بالإذن من بالومبي Palumbi, 2001).

في الباب التالي سوف نراجع الأهداف الرئيسة المُثْبَتَة في البكتيريا التي تعمل عليها الأصناف الرئيسة من المضادّات الحيوية. وفي القسم الأخير من الكتاب سوف نحدد الجهود المبذولة لإيجاد والتحقق من الأهداف الجديدة من المضادّات الحيوية الناجمة من توافر الجينات (genomes) كاملة التسلسل من ما يقرب من خمسة عشر من الأنواع البكتيرية.

سبل وتنظيم هذا الكتاب

يعالج هذا الكتاب المسائل المثارة في الأقسام المذكورة أعلاه. وهو يبحث مصادر المضادّات الحيوية التي تعتبر النتائج الرئيسة في معالجة الأمراض المعدية التي تصيب الإنسان، وآليات عمل هذه المضادّات الحيوية، وطرق تَطوُّر المقاومة الرئيسة، وأخيرا الاستراتيجيات للدورات الجديدة للمضادّات الحيوية والمستبدلة.

بعد هذا الفصل التمهيدي، يحدد الباب الثاني (الفصول من الثاني إلى السادس) الأصناف الرئيسة من المضادّات الحيوية والأهداف القاتلة المُثبتة في البكتيريا، وبالأخص البناء الحيوي لجدار الخلية، البناء الحيوي للبروتين، تكرار وإصلاح الحمض النووي دنا، والبناء الحيوي للفوليت والتكوين الحيوي الجيني (biogenesis) للحمض النووي رنا.

يتناول الباب الثالث (الفصول من السابع إلى العاشر) آليات مقاومة المضادّات الحيوية. ويبدأ هذا القسم بتحليل آليات الحماية الذاتية للسلالات المنتجة للمضادّات الحيوية ومن ثم فحص استراتيجيات المقاومة الثلاث – وتحطيم المضاد الحيوي، عمل مضخات التدفق (efflux pumps)، وتعديل تراكيب أهداف المضادّات الحيوية.

يتناول الباب الرابع (الفصول من الحادي عشر إلى الرابع عشر) المنطق الجزيئي للتكوين الحيوي للمضادّات الحيوية. ويشرح الفصل الأول من هذا الباب كل من جزيئات قانون الاستشعار الذي يعمل بين البكتيريا وإثنين من نظم العناصر التنظيمية التي تنقل المعلومات الواردة من الخارج للتنشيط الانتقائي للجين لتحويل مسارات البناء الحيوي للمضاد الحيوي استجابة للاشارات البيئية. ومن ثم يُحدد منطق خط – التجميع (assembly-line logic) لإيجاد مضادّات بوليكيتيد الحيوية مثل التراسيكلين والإريثروميسين ويُقارن مع منطق خط – التجميع الموازي لصنع مضادّات البِبْتيد الحيوية غير الريبوسومية مثل البنسيلّين، الفانكوميسين والباستراسين (bacitracin). وتعتبر معرفة كيفية عمل خطوط التجميع تمهيداً لهندسة الاستقلاب للجزيئات الجديدة.

يتيح الباب الخامس (الفصول من الخامس عشر إلى السابع عشر) مناقشة ختامية للاستراتيجيات المعاصرة لإيجاد وإنتاج مضادّات حيوية جديدة بواسطة كل من إعادة فحص الأهداف المحددة من قبل وبالجهود الجينية البكتيرية التي أقرت العديد من المنتجات الجينية مثل العوامل المضادة للبكتيريا ويتناول الفصل الأخير الحاجة إلى سياسات لتطويل العمر المفيد للمضادّات الحيوية الحالية والجديدة.



الأهداف المُثْبَتة والأصناف الرئيسة من المضادّات الحيوية
VALIDATED TARGETS AND MAJOR ANTIBIOTIC CLASSES

في هذا الباب من الكتاب، الفصول الثاني إلى السادس، ندرس الأصناف الرئيسة من الأدوية المضادة للبكتيريا التي أثبتت فائدتها في العلاج السريري للأمراض المعدية للإنسان. وصُنّفت المضادّات الحيوية إلى فئات وفقاً لأهدافها على سطح الخلية البكتيري أو داخل الخلية. كما فُحصت الأهداف الأربعة: (أ) تثبيط البناء الحيوي لجدار الخلية البكتيري (الفصل الثالث) بواسطة مضادّات البيتالاكتام والفانكوميسين من صنف الغليكوببتيد (glycopeptides). (ب) المنع الإنتقائي للريبوسومات البكتيرية عند الوحدات الفرعية 30 إس (subunits 50S) بواسطة الأمينوغليكوسيد والتتراسيكلين وعند الوحدات الفرعية 50 إس (50S) من قبل المضادّات الحيوية من عائلة الميكروليد (الفصل الرابع). (جـ) تعمل الأدوية المضادة للبكتيريا مُمَثَّلة بالسبروفلوكساسين (ciprofloxacin)، على عرقلة تكرار الحمض النووي (دنا) بواسطة عرقلة الوسائط (intermediates) المحفزة في التفاعلات الحفَّازة بواسطة إنزيم توبوأيزوميراز دنا (DNA topoisomerase) (الفصل الخامس). (د) يُثبط سبيل الإنزيم المشارك (coenzyme) للبناء الحيوي للفوليت والضروري لتوفير وحدات موحودات (monomers) لتكوين الحمض النووي دنا بواسطة أدوية السلفا والتريميثوبريم (الفصل السادس)، في حين تُعطل الببتيدات ذات الأيونات الموجبة سلامة الغشاء.

Antibacterial Drugs

Natural Products | **Synthetic Molecules**

Amoxicillin

Erythromycin A

Tetracycline

Vancomycin

Sulfamethoxazole

Trimethoprim

Ciprofloxacin

Linezolid

تراكيب المضادّات البكتيرية المستمدة طبيعياً واصطناعياً

الفصل الثاني

مقدمة للأصناف الرئيسة للمضادّات الحيوية وطرق العمل
INTRODUCTION TO MAJOR ANTIBIOTIC CLASSES AND MODES OF ACTION

الأصناف الرئيسة للمضادّات الحيوية في الاستعمال السريري للإنسان

مع أنه قد تم عزل المئات إلى الآلاف من تراكيب المنتجات الطبيعية للبحث عن مضادّات حيوية جديدة، إلا أن عدداً قليلاً فقط من الأنواع التركيبية أثبتت أنها فعّالة وآمنة بما فيه الكفاية لأن تُطوَّر للاستخدام السريري في معالجة الأمراض البكتيرية السريرية. بالإمكان تصنيف الأدوية المضادة للبكتيريا في الاستخدام الحالي بطرق متعدِّدة.

أحدها هو الأثر الاقتصادي كما هو مبين في الجدول (٢,١) لسنة ١٩٩٧م. كان صنف الكيفالوسبورين من مضادّات البيتالاكتام الحيوية الأكثر مبيعاً، في حين يمثل الأموكسسيلين-أموكسيل (amoxicillin-Amoxil) الأشكال الكلاسيكية للبنسيلّين من مضادّات البيتالاكتام الحيوية إلى حد كبير. كما أن الجمع بين مثبطات إنزيم البيتالاكتماز (β-lactamase inhibitors) مع البيتالاكتام في الأموكسيسيلين – كلافولينيت البوتاسيوم (amoxicillin-potassium clavulanate) (أوجمنتين Augmentin)، إميبينيم – سيلاستاتين (imipenem-cilastatin) (بريماكسين Primaxin)، وأمبيسيلين – سلباكتام (ampicillin-sulbactam) (أناسين Unasyn) رفع مبيعات صنف البيتالاكتام إلى حوالي ٦ بليون دولار لتلك السنة. وبلغت مبيعات المضادين الحيويين واسعي – المدى من صنف إرثروميسين، كلاريثروميسين (calrithromycin) (بياكسين Biaxin) وأزيثروميسين (azithromycin) (زيثروماكس Zithromax) ما يقرب من ٢ بليون دولار. والصنف الثالث والرئيسي، الكوينولون، ممثلاً بالسبروفلوكساسين دواء المليون دولار. هذه الأصناف الثلاثة من الأدوية تثبط البناء الحيوي لجدار الخلية، البناء الحيوي للبروتين وإنزيم تكرار الحمض النووي دنا (DNA) والإنزيم اللفائفي دنا غايراز (DNA gyrase) على التوالي. ويشير الجزء الأوسع في سوق المضادّات الحيوية وهذه المرة لسنة ١٩٩٥م بصورة عامة (انظر الجدول ٢,٢) إلى ثلاثة أصناف من الأدوية المضادة للبكتيريا التي حققت أكثر من ٤٠٠ مليون دولار من المبيعات في تلك السنة: أنواع التتراسيكلين، امينوغليكوسيد، وغليكوبِبْتيد. وأدرج في القائمة كذلك الدواء المضاد للدرن (للسل) (antitubercular) ريفامبين (rifampin) ونسخة الكاربابينيم (carbapenem) من البيتالاكتام إميبينيم

(imipenem). وأُشير كذلك إلى الأسماء التجارية، فضلا عن العداوى التي استخدمت فيها هذه الأدوية وحيث توجد مقاومة سريرية معتدة. وهذه الأصناف من المضادّات الحيوية يتم تناولها بالتفصيل في هذا القسم والفصول الأخيرة من الكتاب، مع مناقشة آليات العمل، أنماط نمو المقاومة، وآفاق تَطوُّر صيغ جديدة للتغلب على المقاومة. وصلت المبيعات العالمية لهذه المضادّات الحيوية إلى ما يقارب ٢٤ بليون دولار بحلول عام ٢٠٠٠م.

الطريقة الثانية لتصنيف المضادّات الحيوية هي بواسطة الأمراض البكتيرية التي توصف لعلاجها (مجهول Anonymous, 1999، ليفي Levy, 1998). يبين الجدول (٢,٣) بعض العداوى الشائعة، وقُسمت إلى عمودين على أساس ما إذا كانت العوامل المسبِّبة هي البكتيريا الموجبة – لغرام (gram- positive) أم السالبة – لغرام (gram-negative). وتعكس حالة التصبيغ بصبغة غرام الفروق في تعقيد جدار الخلية (الفصل الثالث) وتعتبر مقياس أوسع للحساسية للمضادّات الحيوية.

الجدول (٢,١). مبيعات المضادّات الحيوي في ١٩٩٧م.

الدواء	ملايين الدولارات
كيفالوسبورين Cephalosporins	
روسيفين Rocephin (روش Roche)	933
سيفتين Ceftin (جلاكسو ويلكوم GlaxoWellcome)	640
سيكلور Ceclor (ليلي Lilly)	542
فورتاز Fortaz (جلاكسو ويلكوم GlaxoWellcome)	449
كلافوران Claforan (هوفمان لا روش Hofmann LaRoche)	335
ماكروليد Macrolides	
بياكسين Biaxin (أبوت Abbott)	1.150
زيثروماكس Zithromax فايزر Pifzer)	619
مثبطات البيتاكتاميز β-lactamase inhibitors	
أوجمنتين Augmentin (جلاكسوسميث كلاين GlaxoSmith Kline)	1.354
بريماكسين Primaxin (ميرك Merck)	555
أوناسين Unasyn (فايزر Pifzer)	619
بنسيلين Penicillins	
أموكسيل Amoxil (جلاكسوسميثكلاين GlaxoSmithKline)	406
كوينولون Quinolones	
سبروفلوكساسين Ciprofloxacin (باير Bayer)	1.290

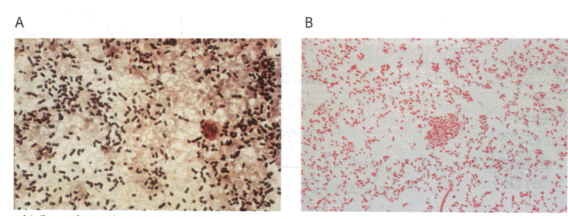
الجدول (٢,٢). سوق المضادّات الحيوية في ١٩٩٥م.

الصنف	المبيعات في جميع أنحاء العالم (ملايين الدولارات)	الأدوية المُمثلة	العداوى التي طورت المقاومة
كيفالوسبورين	8.446	سيفاكلور (Cefaclor) سيفيروكسيم (Ceuroxime)	التهاب القصبة ، الالتهاب الرئوي ، التهاب السحايا
بنسيلّين	4.413	أموكسيسيلين ، أمبيسيلين (Amoxicillin,Ampicillin)	الالتهاب الرئوي ، الإنسمام الدموي ، التهاب القصبة
فلوروكوينولون	3.309	سبروفلوكساسين ، أوفلوكساسين (Ciprofloxacin,Ofloxacin)	متلازمة الصدمة السمية ، التهاب السحايا
ماكروليد	2.927	كلاريثروميسين ، إريثروميسين Clarithromycin,Erythromycin	متلازمة الصدمة السمية ، التهاب السحايا
تتراسيكلين	744	مينوسيكلين Minocycline	عداوى مجرى البول ، مرض الحوض الالتهابي
أمينوكليكوسيد	729	جنتاميسين Gentamicin	العداوى المعوية ، الإنسمام الدموي
غليكوببتيد	462	فانكوميسين Vancomycin	العداوى المعوية
جميع المضادّات الحيوية الجهازية الأخرى	1.873	إميبينيم ، ريفامبين(Imipenem ,Rifampin)	التهاب القصبة ، الدرن

الجدول (٢,٣). البكتيريا الشائعة التي تسبب العداوى.

العداوى	المُمرضات السالبة– لغرام	المُمرضات الموجبة– لغرام
الحروق	الزائفة الزنجارية	المكورة العنقودية الذهبية
عداوى الجلد		المكورة العنقودية الذهبية
الحلق		المكورة العقدية القيحية
التهاب الأذن الوسطى	المستدمية النزلية	المكورة العقدية الرئوية
الالتهاب الرئوي	المستدمية النزلية	المكورة العقدية الرئوية
التهاب شغاف القلب		المكورة العنقودية الذهبية ، المكورة المعوية
الإنسمام (الإنتان) الدموي	الإشريكية القولونية	المكورة العنقودية الذهبية ، المكورة العقدية القيحية
القناة المعدية المعوية	السالمونلا ملهبة الأمعاء – الضرب المصلي تيفيميوريم ، اللولبية البوابية ، الإشريكية القولونية ، الشيغلا الزحارية	
القناة البولية	الإشريكية القولونية	أنواع المكورة المعوية

تتمتع الكائنات الدقيقة السالبة – لغرام بحاجز سليم ضد نفاذية الغشاء الخارجي، في حين أن الكائنات الدقيقة الموجبة – لغرام لا تتمتع بذلك، وبشكل عام، ولهذا السبب، فالمضادّات الحيوية كالفانكوميسين تستطيع أن تمنع النمو البكتيري للبكتيريا الموجبة – لغرام وليس للبكتيريا السالبة – لغرام، كما شُرح بالتفصيل في الفصول اللاحقة من هذا القسم. بعد اختبار التصبيغ، تظهر البكتيريا الموجبة – لغرام أرجوانية/سوداء في حين تُظهر البكتيريا السالبة – لغرام ألواناً حمراء. تُظهر اللوحة الملونة (٢,١ A) صورة للبكتيريا المكورة العقدية الرئوية (*Streptococcus pneumoniae*) الموجبة – لغرام والمعزولة من السائل المخي الشوكي (cerebrospinal fluid) لمريض مصاب بالتهاب السحايا (meningitis). تُظهر اللوحة الملونة (٢,١ B) صبغة غرام لمزرعة الإشريكية القولونية (*Escherichia coli*)، مع الظهور النمطي الأحمر للبكتيريا السالبة – لغرام.



اللوحة الملونة (٢,١). صبغات غرام للمكورة الرئوية الموجبة – لغرام (A) والإشريكية القولونية السالبة – لغرام (B). (من إليوت وآخرون Elliot *et al*, 1997).

تعتبر المكورات العقدية (streptococci) مُمْرِضات مهمة في الالتهاب الرئوي، التهاب السحايا، وعداوى الأذن الوسطى في حين أن المكورات العنقودية (staphylococci) الموجبة – لغرام والمكورات المعوية (enterococci) مُمْرِضات ذات إشكالية في عداوى بعد – الجراحة. ما زالت المتفطرة السلية (*Mycobacterium tuberculosis*) الموجبة – لغرام تسبب ملايين الوفيات سنوياً. كما أن التاريخ الكارثي للطاعون والكوليرا سببه نوعان من البكتيريا السالبة – لغرام، اليرسنية الطاعونية (*Yersinia pestis*) والضمة الكوليرية (*Vibrio cholerae*)، على التوالي، في حين أن سلالات الإشريكية القولونية، السالمونيلا (*Salmonella*) والشيغيلا (*Shigella*) هي الأسباب الشائعة للأمراض الاسهالية. غالباً ما توصف الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*) السالبة – لغرام بأنها مُمْرِضات انتهازية (opportunistic pathogen)، وتسبب أمراض في الحالات التي قد يكون للمريض مناعة منقوصة و/أو بعض الأمراض المستبطنة مثل التليف الكيسي (cystic fibrosis). وسنلاحظ أن للزائفة الزنجارية جوانب كثيرة تسهم في انخفاض الحساسية للعديد من أصناف الأدوية المضادة للبكتيريا، مما يجعلها مُمرض صعب المعالجة.

لن يركز هذا الكتاب على نواحي الصيدلة السريرية للأدوية المضادة للمكروبات الموجودة أو النظم المستخدمة في معالجة الأمراض المعدية. إن اثنين من الكتب الممتازة الوافية وذات التغطية الحديثة التي تخص الجوانب الرئيسة للمضادّات الحيوية هي *الأدوية المضادة للمكروبات (The Antimicrobial Drugs)* (الطبعة الثانية)، بواسطة شولار وبرات (Scholar and Pratt, 2000)، *والمعالجة الكيميائية المضادة للمكروبات (Antimicrobial Chemotherapy)* حُررت بواسطة جرينود (Greenwood, 2000). وفي الكتاب الأخير يوجد قسم مخصص لمعالجة الأمراض البكتيرية في مختلف الأنسجة، مثل عداوى القناة التنفسية، وعداوة القناة البولية، وعداوى الجلد والأنسجة الرخوة، وتجرثم الدم، والتهاب شغاف القلب، والدرن.

بعض العداوى البكتيرية مثل الالتهاب الرئوي غالباً ما تُكتسب من بيئة المجتمع، وكذلك الطاعون والكوليرا والأمراض الإسهالية، في حين أن البعض الآخر قد يُكتسب أثناء الإقامة بالمستشفى أو ما يسمى بالعداوى المستشفوية (nosocomial infections). تقع المكورات العنقودية والمكورات المعوية التي تسبب عداوى بعد - الجراحة (post-surgical infections) ضمن الفئة الأخيرة، ونظراً لأنها توجد في بيئات تُستعمل فيها المضادّات الحيوية بشكل مستمر، فالكثير من سلالات المكورات العنقودية والمكورات المعوية مقاومة للمضادّات الحيوية وتُعتبر بكتيريا ذات إشكالية على وجه الخصوص (لوّي Lowy, 1998). إن المكورات العنقودية ذات المقاومة للبنسيلّين وخاصة للمشيلين (methicillin) يمكن أن تحدث بمعدل عالٍ (40% معدل الإصابة بالمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمشيلين (MRSA)) و(٥٠٪ بالمكورة العنقودية البشروية (*S.epidermidis*) في بعض الأجنحة السريرية). وتتميز هذه العوامل المسبِّبة للأمراض بمعدلات وفيات عالية (٢٥-٦٣٪) في عداوى الدم بالمستشفى (تجرثم الدم bacteremias). وفي أواخر التسعينيات بلغت عداوى المستشفى بالمكورات المعوية إلى ١٢٪ في بعض المدن الأمريكية مع زيادة ١٥٪ في معدل المقاومة للفانكوميسين. وينتج عن العداوى بالمكوراتية المعوية المقاومة للفانكوميسين (vancomycin-resistant enterococcal) (VRE infections) معدل وفيات من ٤٢-٨١٪.

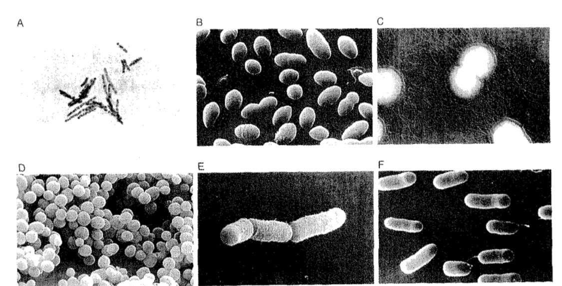
الخط الأول النموذجي لسبل المعالجة بالمضاد الحيوي، كما نُشر في *الرسالة الطبية (The Medical Letter)* (مجهول Anonymous، 2001)، لُخص في الجدول (٢,٤).

الجدول (٢,٤) يتداخل مع بيانات الجدولين (٢,١) و(٢,٢) على استخدام الكيفالوسبورين، ماكروليد، كوينولون، أمينوغليكوسيد، وفانكوميسين. ويلاحظ أيضاً تجميعة (توليفة) ترايميثوبريم - وسلفاميثوكسازول (trimethoprim-sulfamethoxazole combination)، فوسفوميسين (fosfomycin)، وكوكتيل الدواء المضاد للدرن، وجميعها سيتم تقييمها أكثر في فصول هذا القسم. يمكن الحصول على قائمة أوسع من المضادّات الحيوية الموصى بها للأمراض البكتيرية والعوامل المرجحة المسبِّبة في الجدول (١,٣) من شولار وبرات (Scholar and Pratt، 2000)، وكذلك جدولهم (١,٥) الذي يشتمل على المضادّات الحيوية المستعملة في التوقية الجراحية على أساس المواقع الجراحية النظيفة مقابل الملوثة.

تُستخدم العديد من المضادّات الحيوية في حالات معينة وضد المُمْرضات الخاصة، على سبيل المثال، يُستخدم باستراسين (bacitracin) موضعياً ضد عداوى الجلد وتتراسيكلين ضد العداوى التي تسببها اللولبية *(Helicobacter)*، الضمة الكوليرية، والبروسيلا (Brucella). وبعض هذه العوامل المسبِّبة للأمراض تظهر في الشكل (٢,١)، الذي يسلط الضوء على أشكالها (morphology) المتميزة.

الجدول (٢,٤). موجز لسبل الخط – الأول النوعي للمعالجة بالمضادّات الحيوية.

العدوى	المُمرض المرجح	الاختيار الأول المعقول للمعالجة
التهاب الرئة المكتسب من المجتمع	المكورة العقدية الرئوية	للمرضى المنومين: واسع – المدى أو كيفالوسبورين "الجيل الرابع"، للمرضى المتحركين: ماكروليد المتوفر فموياً أو فلوروكوينولون
التهاب الرئة المكتسب من المستشفى	البكتيريا السالبة – لغرام أو المكورة العنقودية	للزائفة الزنجارية: كيفالوسبورين واسع المدى أو "الجيل الرابع"، إميبينيم، وأمينوغليكوسيد، وفانكوميسين لـ MRSA
التهاب السحايا	المكورة الرئوية أو النيسرية السحائية	كيفالوسبورين واسع – المدى + فانكوميسين + ريفامبين
متلازمة الإنتان	العصيات السالبة لغرام ولكن كذلك المكورات الموجبة لغرام مثل MRSA	كيفالوسبورين + امينوغليكوسيد، فانكوميسين
عداوى القناة البولية	البكتيريا السالبة لغرام مثل الإشريكية القولونية	سلفاميثوكسازول + ترايميثوبريم، فلوروكوينولون، فوسفوميسين
الدرن	المتفطرة السلية	أيزونيازيد + ريفامبين + بيرازيناميد + إيثامبيوتول



الشكل (٢,١). عرض صور المجهر الإلكتروني لبعض المُمرضات البكتيرية. (A) المتفطرة السلية في البلغم، (B) المكورة المعوية البرازية (*Enterococcus faecalis*)، (C) المكورة العقدية الرئوية، (D) المكورة العنقودية الذهبية، (E) الزائفة الفلورية (*Pseudomonas fluorescence*)، (F) المستدمية النزلية (*Haemophilus influenzae*). المرئيات غير المحدودة، جميعاً © د. م. فليبز (D.M.Philips) ما عدا الشكل (A)© م. آبي (M.Abbey).

كل واحد من أصناف المضادّات الحيوية المعروضة في الجدول (٢،٥) قد ظهر بواسطة الخبرة المتراكمة أنه يكون أكثر فائدة ضد بعض المُمْرضات البكتيرية أكثر من غيرها في الحالات السريرية المختلفة. وعلى الأرجح فإن القيود على استعمالها هي مزيج من كل من مستويات المضادّات الحيوية وكفاءة الاختراق (penetration efficacy) في مكان العدوى والحساسية الداخلية لهدف المضاد الحيوي في البكتيريا المُستقبلة (recipient bacteria). ولقد تقدمت مضادّات البيتالاكتام الحيوية من خلال عدة مراحل من الاستمثال للبنسيلّين ذي الخمس – حلقات (five-ring) وإلى أربعة تكرارات للكيفالوسبورين ذي الست – حلقات (six-ring) للتغلب على ظهور السلالات المقاومة للأجيال السابقة من هذه الأصناف من المضادّات الحيوية. وبالمثل، في مضادّات الميكروليد، سواء إريثروميسين الأصلي وما تبعه مثل كلاريثروميسين وأزيثروميسين وكليهما في السوق. تظهر تراكيب بعض أنواع البنسيلّين والكيفالوسبورين التي تستخدم على نطاق واسع في الوقت الحالي في الجدول (٢،٥)، وكذلك مزيج الأموكسيسيلين والكلافولينيت، الذي يباع تحت الاسم التجاري، أوجمنتين (Augmentin). كما تستخدم المضادّات الحيوية ضيقة – المدى (إريثروميسين) والواسعة – المدى (أزيثروميسين وكلاريثروميسين) الأعضاء من مضادّات بوليكيتيد ميكروليد (macrolide polyketide) على نطاق واسع وكذلك الفلوروكوينولونات (fluoroquinolones) والأمينوغليكوسيد ممثلة أيضاً، جنباً إلى جنب مع مضادّات الغليكوببتيد (glycopeptides) الحيوية فانكوميسين وتيكوبلانين (teicoplanin). أما مجموعة الترايميثوبريم – سلفاميثوكسازول، وهي ضمن أقدم المضادّات الحيوية فما زالت في السوق بعد عقود من الإدخال السريري لها.

الجدول (٢،٥). المضادّات الحيوية الرئيسة: تركيبات الأصناف، الأهداف، وآليات المقاومة.

المضاد الحيوي	الهدف	آلية المقاومة
جدار الخلية		
بيتالاكتام	ترانسببتيداز Transpeptidases/ ترانسغليكوزيلايز transglycosylase (PBPs[1])	بيتلاكتامازات β-lactamases، طفرات PBP
فانكوميسين تيكوبلانين	د-ألا-د-ألا-المحطة الفرعية للببتيدوغليكان والدهن 11 (-Ala-D-Ala terminal of peptidoglycan and lipid 2)	إعادة برمجة د-ألا-د-ألا إلى د-ألا-د-لاس أو د-ألا-د-سير (D-Ala-D-Lac or D-Ala-D-Ser)
تكوين البروتين		
إريثروميسين	ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) (peptidyltransferase) / ريبوسوم	مثيلة rRNA / تدفق
تتراسيكلين	ببتيديل ترانسفيراز(ناقلة الببتيديل)	تدفق الدواء
امينوغليكوسيد	ببتيديل ترانسفيراز(ناقلة الببتيديل)	تعديل الدواء
أوكسازوليدينون	ببتيديل ترانسفيراز(ناقلة الببتيديل)	غير المعروف
تكرار/ وتعديل		
دنا فلوروكوينولون	(دنا غيراز) DNA gyrase	طفرات الجيريز

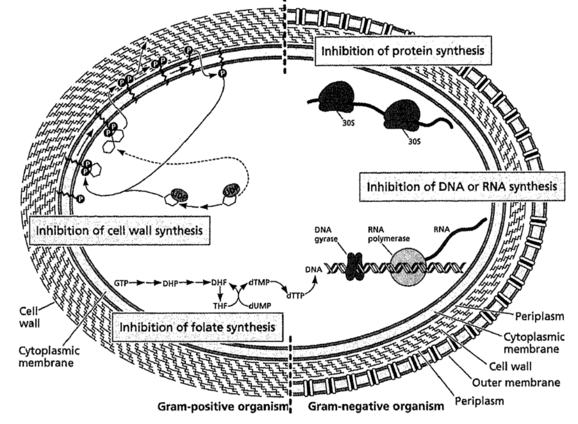
PBP[1]: البروتين المرتبط بالنسيلين.

الأهداف التي تصيبها المضادّات الحيوية في البكتيريا

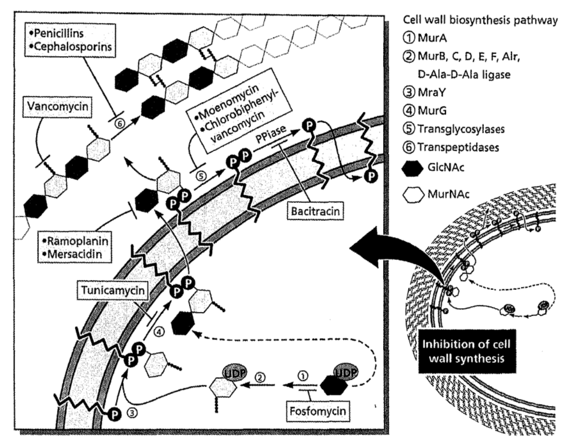
تم إثبات آليات عمل معظم الأدوية المضادة للبكتيريا بعد اكتشاف أن للجزيئات آثار على النمو البكتيري، إما بإبطاء النمو إلى حد كبير (مثبط للنمو) وإما قاتل للبكتيريا (مبيد للبكتيريا) ثم تم فحص الجزيئات ذات الفائدة العلاجية الواضحة والمحتملة لدراسة الأساس الجزيئي لخصائصها المضادة للبكتيريا وانتقائيتها (selectivity) وكذلك السمية المصاحبة لها وقد انبثقت أربعة أهداف رئيسة في المُمرضات البكتيرية بعد عقود من دراسة آلية عمل المضاد الحيوي (الشكل ٢.٢) وهي التكوين الحيوي لجدار الخلية، والتكوين الحيوي للبروتين، تكرار وإصلاح الحمض النووي دنا، والتكوين الحيوي للإنزيم المساعد للفوليت. وكل من هذه الأهداف وآليات عمل الأصناف الرئيسة من المضادّات الحيوية التي تعترض واحداً أو أكثر من الخطوات في هذه السبل سوف تناقش بالتفصيل في الفصول من الثالث إلى السابع. الشكل (٢.٢) عبارة عن رسم توضيحي للفصول من الثالث إلى العاشر، وسوف تركز هذه الفصول على توضيح المسارات المتميزة لعمل المضادّات الحيوية والمقاومة للمضادّات الحيوية.

أحد المبادئ الرئيسة للقتل الانتقائي للبكتيريا مع تجنب المضيف البشري الذي يستعمل المضاد الحيوي، هو بأن يعمل المضاد الحيوي ضد الهدف الموجود في البكتيريا والذي لا يوجد في الحيوانات والإنسان. ينطبق هذا المبدأ على هدفين من الأهداف المحددة، وهي إنزيمات البناء الحيوي لجدار الخلية البكتيرية وإنزيمات البناء الحيوي لمسارات حمض الفوليك (folic acid)، التي ليس لها نظيرات في الإنسان. ومن الواضح أن للهدفين الرئيسين الآخرين للمضادّات البكتيرية، البناء الحيوي للبروتين وآلية تكرار وإصلاح الحمض النووي دنا نظراء في الإنسان، ولكن توجد اختلافات تركيبية كافية في الحمض النووي وآلية بناء البروتين بين بدائية النواة (prokaryotic) وسوية النواة (euokaryotic) مما يحقق التثبيط الانتقائي.

عمليات التكوين الحيوي لجدار الخلية والبناء الحيوي للبروتين على الريبوسومات والتي كانت تاريخياً موقع عمل أكبر عدد من المضادّات الحيوية وربما بسبب العديد من الخطوات الإنزيمية التي توفر فرص متعدِّدة لتعطيل هذه الخصائص الرئيسة للخلية البكتيرية السليمة. إن التسلسل الجيني (genomic sequencing) لأهم مسببات الأمراض البكتيرية قد اكتمل أساساً، والجهود المبذولة لتحديد الجينات الأساسية أو الجينات المعززة للفوعية (virulence-enhancing genes) جارية على قدم وساق ،كما جاء في الفصل الخامس عشر، والتي تعرض نهج جزيئي وجيني جديد للأهداف المقصودة الجديدة التي لم تكن مستهدفة بواسطة المنتجات الطبيعية من المضادّات الحيوية القائمة. وستكون هذه هي المرشحات الرئيسة للمسوحات المبنية على المكتبة –الاصطناعية لتطوير مضادّات حيوية فعالة جديدة.



الشكل (٢,٢). الأهداف الرئيسية لعمل المضادّات البكتيرية. (مقتبسة من ملصق عن آليات العمل والمقاومة للمضادّات الحيوية / *Mechanisms of Antibiotic action and resistance*)، سي والش، جي تروجر، بي كورفالين، وجي ديفيس (2001)، الاتجاهات في علم الأحياء الدقيقة *(Trends In Microbiology)*، لانسيت للأمراض المعدية *(Lancet Infectious Diseases)*، الرأي الحالي في الأحياء الدقيقة *(Current Opinion in Microbiology)*، الاتجاهات في الطب الجزيئي *(Trends in Molecular Medicine)*.



المضادّات الحيوية التي تعمل على التكوين الحيوي لجدار الخلية

الفصل الثالث

المضادّات الحيوية التي تعمل على البناء الحيوي لجدار الخلية
ANTIBIOTICS THAT ACT ON CELL WALL BIOSYNTHESIS

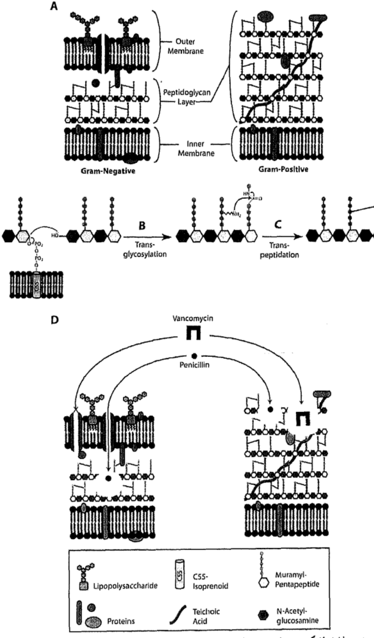
يتناول هذا الفصل المضادّات الحيوية التي تعترض أي من الخطوات المتعدِّدة في تجميع - جدار الخلية البكتيري (cell wall assembly)، من التوليد الجيني (biogenesis) للموحودات (monomers) إلى التجميع المتخصص، الانتقال عبر الغشاء، والربط - التبادلي خارج الخلية (extracellular cross-linking) وتقوية الهيكل الخارجي لطبقات الببتيدوغليكان. في الصفحة المواجهة للشكل (٢,٢) توجد صورة مكبَرة لجزء من الشكل وهي تظهر التفاعلات على البناء الحيوي لجدار الخلية والمضادّات التي تمنعه.

أوجه الشبه والاختلاف في تركيب جدار الخلية الموجبة - لغرام والسالبة - لغرام التي تؤثر على الحساسية للمضادّات الحيوية

البكتيريا مثل الإشريكية القولونية والسالمونيلا والزائفة واليرسنية هي بكتيريا سالبة — لغرام، بينما المكورات العنقودية، والمكورات العقدية، والمكورات المعوية موجبة - لغرام. ويعتمد الاختلاف في الاحتفاظ بالصبغة، "كريستال البنفسج" (crystal violet) في محلول الإيثانول (ethanol) على مدى سلامة الغشاء الخارجي للبكتيريا (الكائنات السالبة - لغرام) أو إذا كان غير كامل ومجزأ (الكائنات الموجبة - لغرام) (الشكل ٣,١ A) (ليي وشنيويند Lee and Schneewind, 2001، نافاري وشنيويند Navarre and Schneewind, 1999، نيكايدو Nikaido, 1994). لكل من البكتيريا السالبة والموجبة - لغرام طبقة الببتيدوغليكان كجزء من تركيب جدار الخلية لها. إن طبقة الببتيدوغليكان عموماً ولحد بعيد أكثر سماكة ومتعدِّدة الطبقات في البكتيريا الموجبة - لغرام (الشكل ٣,١ A).

وتتشابك طبقة الببتيدوغليكان، مع خيوط الجليكان والبِبْتيد المتعامدة (orthogonal glycan) (الشكل ٣,١ B)، الربط - التبادلي (cross-linking) الإنزيمي لخيوط الجليكان، بواسطة عمل إنزيم ترانسغليكوسيلاز (transglycosylase)، وكذلك خيوط البِبْتيد بواسطة عمل إنزيم ترانسببتيداز (transpeptidase) (الشكل ٣,١ C). يدخل الربط - التبادلي وصلات ربط تساهمية للشبكة، ويتيح القوة الميكانيكية، كما وتوفر تراكيب الحاجز الرئيسة أمام قوى الضغط

التنافذي (الأزموزي) (osmotic pressure) التي قد تقتل البكتيريا. تمنع العديد من المضادّات الحيوية التي تؤثر على جدار الخلية البكتيري، الإنزيمات أو تنحي المواد المشاركة في تجميع الببتيدوغليكان والربط – التبادلي، كما سنلاحظ في الأقسام اللآحقة من هذا الفصل.



الشكل (٣,١). تراكيب جدار الخلية للبكتيريا الموجبة والسالبة – لغرام: (A) الاختلافات في نفاذية حواجز الغشاء الخارجي، (B) إطالة الببتيدوغليكان بواسطة عمل إنزيم ترانسغليكوسيلاز، (C) الربط – التبادلي للببتيدوغليكان بواسطة عمل إنزيم ترانسببتيداز، (D) اختراق المضادّات الحيوية للغشاء الهيولي (السيتوبلازمي) في البكتيريا الموجبة – لغرام.

لقد وُصفت طبقة الببتيدوغليكان السميكة للبكتيريا الموجبة - لغرام بأنها جزيء عضوي سطحي، لعرض الكربوهيدرات والبروتينات في حين أن الغشاء الخارجي هو جزيء السطح العضوي المكافيء لهذا في البكتيريا السالبة - لغرام (ليي وشنيويند Lee and Schneewind, 2001). إن لكل من البكتيريا السالبة والموجبة - لغرام بروتينات ترتبط بشكل تساهمي مع سلاسل الببْتيد (peptide chains) في طبقة الببتيدوغليكان (الجدول ٣،١) (برون وهنتكي Braun and Hantke, 1974). وبعض بروتينات الغشاء الخارجي هذه تعمل كلاصقات (adhesions) للبروتينات المحددة على أغشية الخلية للفقريات، مثل غزو البروتين من اليرسنية السلّية الكاذبة (Yersinia pseudotuberculosis)، الذي يرتبط مع بروتينات بيتا ١- إنتجرين (β1-integrin) المنتشرة على الخلايا المضيفة وهو التفاعل المطلوب للاختراق البكتيري إلى الأنسجة اللمفية المعوية (أيسبرج و ليونج Isberg and Leong, 1990). تتصل بروتينات السطح المرتبطة مع طبقة الببتيدوغليكان السميكة في البكتيريا الموجبة - لغرام أثناء التكوين الحيوي بفعل إنزيم سورتاز (sortase)، الذي نوقش في الفصل الخامس عشر كهدف محتمل للمضادّات البكتيرية. إن الغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة - لغرام غير متماثل في تكوين الدهن (الشحم)، حيث إن الدهون الفسفورية (phospholipids) موجودة في الطبقة (الوريقة) الداخلية ودهن A (lipid A) هو الدهن الغالب في الطبقة الخارجية (ريتز Raetz, 1987)، مع سلاسل مستضدات O (O-antigen chains) المتغيرة المرتبطة تساهمياً والتي تواجه البيئة الخارجية كسطح كربوهيدرات عالي الإستضاد (الشكل ٣،١ A). ولطبقة الببتيدوغليكان السميكة في البكتيريا الموجبة - لغرام كذلك بوليمرات (مكثورات) أحماض التيكويك (polymers of teichoic acids) مرتبطة بها (الشكل ٣،١ A). كما يمكن لكربوهيدرات وبروتينات السطح أن تخدم العديد من الأدوار، ويشمل ذلك الحماية ضد قتل الخلية - المضيفة، تقديم ربيطات (مركبات ترابطية) (ligands) محددة للارتباط بالسطوح الأحيائية واللاأحيائية، ويسهل التحويل بين (interconversion) أشكال خلية الحرق السطحي (singe cell forms) (حيوانات نباتات صغيرة جداً) (planktonic) ومجتمعات القشرة الحيوية الرقيقة (الفلم الحيوي) (biofilm) للبكتيريا.

إن البكتيريا الموجبة - لغرام حساسة لبعض المضادّات الحيوية التي لا تعمل أو تعمل بشكل ضعيف (مثال: ضد الزائفات pseudomonads) ضد البكتيريا السالبة - لغرام، وهذا الاختلاف يتعلق بقدرة المضادّات الحيوية على أن تُعطَّل بواسطة الحد من أحجام مسام (pore sizes) بروتينات بورين (proteins porin) في الأغشية الخارجية للكائنات السالبة - لغرام (الشكل ٣،١ A و D) (كوبنك وآخرون Koebnik *et al*, 2000). كما وأنه لا يوجد مثل هذا الحاجز للانتشار في البكتيريا الموجبة - لغرام. فالفانكوميسين، على سبيل المثال، لا يستطيع اختراق الغشاء الخارجي وعليه فهو فعال كمضاد حيوي ضد المُمرضات الموجبة - لغرام فقط. وفي البكتيريا السالبة - لغرام، الفضاء بين الأغشية الداخلية والخارجية هو الفضاء حول الجبلّة (periplasmic space) (الشكل ٣،١ D). إضافة إلى خيوط طبقة الببتيدوغليكان وللجبلّة إنزيمات متحللة بالماء (hydrolytic enzymes) لتحوّل النيوكليوتيدات الناقصة والمتعدِّدة القسمة (oligomeric and nucleotides polymeric)، الببتيدات، والسكريدات (saccharides) إلى موحودات (monomers) والتي

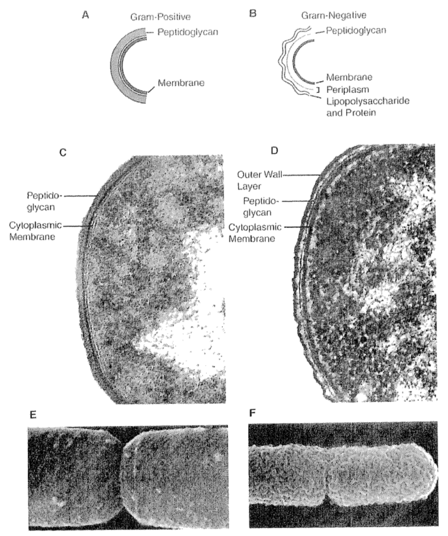
من ثمَ ترتبط بواسطة بروتينات حول الجبلّة الناقلة، والمقدمة إلى بروتينات الغشاء الناقلة ومن ثم إدخالها. ويوجد كذلك بروتينات تعمل كوصيفات تساعد البروتينات التي يتم إفرازها إلى الغشاء الخارجي لتنثني وتعبر فضاء الجِبلّة.

إن كل من تراكيب جدار الخلية هذه هو هدف محتمل للإعاقة بواسطة المضادّات الحيوية. ويمكن أن تؤدي الخواص المتميزة للأغشية الخارجية حتى بين البكتيريا السالبة – لغرام إلى الاختلافات في النفاذية للمضادّات الحيوية. فعلى سبيل المثال، تُظهر الأغشية الخارجية للزائفة الزنجارية حوالي ١٠٠ – أضعاف أقل نفاذية للكيفالوسبورين مثل كيفالوريدين (cephaloridine) (نيكايدو Nikaido, 1998) عن غيرها من البكتيريا السالبة – لغرام ويرجع ذلك جزئياً إلى البورينات ذات المسام الصغيرة التي تحد من المرور الداخلي للمضادّات الحيوية إلى فضاء الجِبلّة.

المظاهر المميزة لجدران الخلية للبكتيريا السالبة لغرام والموجبة – لغرام يمكن تمييزها في كل من المراسم الدقيقة الإلكترونية الانتقالية (transmission electron micrographs) والمراسم الدقيقة الإلكترونية التفرسيَّة (scanning electron micrographs). وفي الشكل (٣،٢ A و٣،٢ B)، عُكست مخططات جدار الخلية بواسطة صورة أرثروباكتر كريستالوبويتيز *(Arthrobacter crystallopoietes)* الموجبة – لغرام (الشكل ٣،٢ C) والشعرة البيضاء العفنة *(Leucothrix mucor)* السالبة – لغرام (الشكل ٣،٢ D). صور المسح للعصية الرقيقة *(Bacillus subtilis)* (الشكل ٣،٢ E) والإشريكية القولونية السالبة – لغرام (الشكل ٣،٢ F) تُظهر أنسجة (بنية) سطح مختلفة.

الجدول (٣،١). البروتينات المرتبطة بشكل تساهمي مع الببتيدوغليكان.

الفئة الوظيفية	البروتين المثال	الآلية
الحماية من جهاز المناعة	البروتينات من عائلة -M	تحول جيني – مضاد للبلعمة
	بروتين A	تحول جيني – مضاد للبلعمة
	C5a ببتيداز	يدمر الجاذب الكيميائي
التركيبية	بروتينات شحمية	ترتبط بالغشاء الخارجي
	أهداب	تتجمع لتكوّن خيوط
العدوى/ الفوعية	إم إس سي آر إيه إم إم إس (MSCRAMMs)	يربط مكونات قالب خارج الخلية
	الغزو	يرتبط ببيتا ١ إنتجرين (β-1 integrin)، غزو النسيج.
	إنترنالين (Internalin)	يُسهل غزو الخلية المضيفة
اكتساب الغذاء	غليكوسيداز glycosidase	يفلق السكريد
	ببتيداز peptidase	يفلق الببْتيد
	نيوكليوتيداز nucleotidases	يفلق قليل – ناقص النيوكليوتيد oligonucleotides
التصاق الخلية البكتيرية	مادة تجميع	ترتبط بمادة ربط المكورات المعوية
	بروتين استبعاد السطح	يمنع التزاوج بين البكتيريا ذات البلازميدات المتشابهة بواسطة آلية غير معروفة



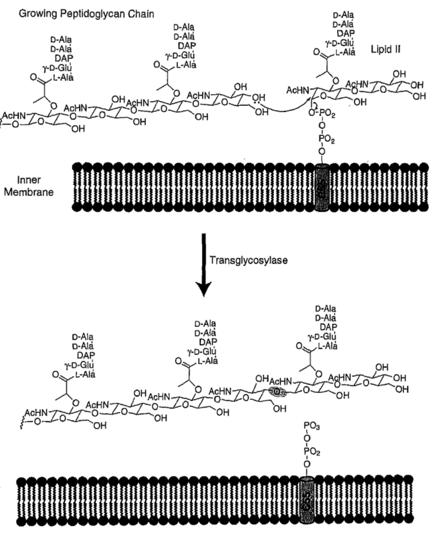
الشكل (٣,٢). جدران الخلية للبكتيريا. (A وB) رسوم تخطيطية لجدران الخلية الموجبة لغرام (A) والسالبة– لغرام (B). (C وD) تُظهر المراسم الإلكترونية الدقيقة جدران للبكتيريا الموجبة – لغرام، أرثروباكتر كريستالوبويتيز (C)، و للبكتيريا السالبة – لغرام، الشعرة البيضاء العفنة (D). (E، F) المراسم الإلكترونية التفرسية الدقيقة للبكتيريا الموجبة – لغرام (العصية الرقيقة) (ث) والسالبة – لغرام (الإشريكية القولونية) (F). لاحظ بنية السطح في الخلايا التي تظهر في اللوحتين E، F. الخلية الواحدة للعصية الرقيقة أو الإشريكية القولونية هي حوالي ١ ميكروميتر في القطر.

ثلاث مراحل للتجميع الإنزيمي للبِبْتيدوغليكان: سيتوبلازمي (هيولي)، المرتبط بالأغشية، وخارج السيتوبلازمي

الإنزيمات في المرحلة السيتوبلازمية لمسار مور (Mur pathway): مور أ– ف (Mur A-F)

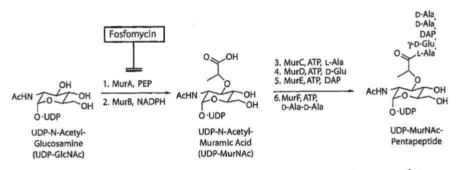
عندما تنمو وتنقسم البكتيريا، يجب وضع طبقة (أو طبقات) الببتيدوغليكان بشكل أفقي وجانبي على حد سواء (لتشكيل حاجز) (هولتجي Holtje, 1998). إن وحدة الببتيدوغليكان التي أُضيفت إلى طبقات الببتيدوغليكان

المتدة هي ببتيد مخموس ثنائي السكريل (disaccharyl pentapeptide) والتي قُدمت في سطح الغشاء في حين أنها مرتبطة بشحم (دهن) سي ٥٥ (C_{55}) (undecaprenyl) (شحم ٢) في رابطة فوسفوديايستر (phosphodiester linkage) التي يحدث لها إنفلاق في خطوة نقل الغليكوسيل (transglycosylation) (الشكل ٣،٣). يتوفر لكل من الدهن، السكريات وأجزاء (أنصاف) الببْتيد المخموس (pentapeptide moieties) إنزيمات متخصصة بتجميع الببتيدوغليكان. تعرف طبقة الببتيدوغليكان كذلك بالميورين (murein) (من اليونانية "حائط") وتسمى الجينات للخطوات الأولى في التجميع *murA-G* (فان هيجينورت van Heijenoort, 2001a).



الشكل (٣،٣). عمل الترانسغليكوسيلازات (transglycosylases) على C_{55} – الشحم – المرتبط بركازة الببْتيد المخموس إن – أسيتيل ميوراميل (N-acetyle-muramyl) (MurNAc).

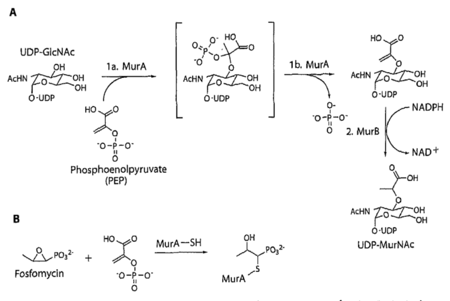
أُنجزت المرحلة السيتوبلازمية لتجميع الميورين (murein assembly) بواسطة الإنزيمات الست ميور أ–ف (MurA-F)، بدأً من نيوكليوتيد السكرالثنائي الفسفور UDP-*N* أسيتيل غلوكوسامين (disphosphosugar UDP-N- nucleotide acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) ويتبع إلى ميوراميل الخماسي البِبْتيد، و-UDP-mumarmyle-L-Ala-D-γ-Glu *meso*- diaminopimelate -D-Ala-D-Ala (الشكل ٣,٤). تُصنع UDP-GlcNAc ذاتها بواسطة إنزيم ذا وظيفة ثنائية، GlmU (جيهرنج وآخرون Gehring *et al*., 1996، مينجن – لاسريلوكس Mengin-Lecreulux وهيجينورت Heijenoort, 1994)، الذي يعمل على أستلة الغلوكوسامين- 1P ومن ثمَّ على uridylylates.



الشكل (٣,٤). تجميع UDP-MurNAc البِبْتيد المخموس بواسطة الإنزيمات الستة ميور A– F.

يتطلب تحويل GlcNAc إلى نصف ميوراميل بناء ٣- أو- إيثر الآكتيل (3'*O*-lactyle ether) من بقايا GlcNAc وينجز ذلك بواسطة إنزيمين هما ميور A و ميور B (murA and mur B) (الشكل ٣,٥ A). يستخدم ميور A فوسفواينول بيروفيت (PEP) phosphoenolpyruvate)) كمادة مشاركة ويُثبت ترابط إيثر ٣- أو إينول بيروفيت (ether 3'-*O*-enolpyruvate) بواسطة إضافة/ حذف تسلسل غير عادي، حيث إن ٣- أكسجين (3'-oxygen) في GlcNAc يضاف إلى الرابطة المضاعفة لـ PEP، ريجيو- (-regio) ويتجسيم نوعي (sterospecifically) عند C_2 و C_3 تصبح مجموعة مثيل (methyle group) بشكل عابر (كاسيدي وكاهان Cassidy and Kahan, 1973، والش وآخرون *et al*.,1996a Walsh). والخطوة الثانية هي التخلص بواسطة الإنزيم – الحفَّاز من H^+ و Pi لتوليد إيثر الإينول (enol ether). يعتبر ميور B هو مؤكسد للفلافوبروتين (flavoprotein) الذي يُضيف هيدريد (hydride) إلى C_3 ويروتونيت C_2 (protonates) لتوليد إيثر اللاكتيل (lactyle ether) وإنتاج حامض الميوراميك (acid UDP- muramic) (بنسون وآخرون Benson *et al*., 1993). إن كاربوكسيلات إيثر اللاكتيل هو الموضع لبناء سلسلة البِبْتيد الاحقة بواسطة ميور F,E,D,C. لقد تم تحديد الأشعة السينية لتراكيب ميور A وميور B (بنسون وآخرون ١٩٩٥، شونبرون وآخرون Schonbrunn *et al*., 1996، سكارزينسكي وآخرون Skarzynski *et al*., 1996) وتعزز الملاحظات الآلية المذكورة أعلاه معماريا. يعتبر ميور A هو الهدف للمضاد الحيوي فوسفوميسين (انظر الجدول ٢,١ الموصى باستخدامه في معالجة عداوى المسالك

البولية)، هو مستقلب ثلاث - كربونات إبوكسي بوبيل فوسفونيت (epoxy propyl phosphonate) بسيط من المتسلسلات (streptomycetes) (سيتو Seto, 1997) والذي يعمل لتعطيل مُناظر PEP (الشكل ٣,٥ B). يوجد موقع سيستين (cysteine) نشط في ميورA، Cys-115 في ميور A في الإشريكية القولونية الذي فيه تفتح سلسلة ثيوليت الجانبية (thiolate side chain) إبوكسيد (epoxide) الفعال للفوسفوميسين المقيَد، لينتج حبل تساهمي مستقر ليسد الموقع الفعال ويمنع الانتهاء المحفز اللآحق. لقد تم تحديد التركيب بالأشعة السينية للفوسفوميسين- ذا ميور A المعطل (سكارزينسكي وآخرون Skarzynski *et al.*, 1998) والذي ينبغي أن يكون عوناً لتصميم - خلفاء لفوسفوميسين. لقد تم الإبلاغ حديثاً عن مثبطات ثيازوليدينون (thiazolidinone inhibitors) لميور B (أندريس وآخرون Andres *et al.*,2000).



الشكل (٣,٥). (A) العمل المتعاقب لميور أ وميور ب لتحويل أسيتيلجلوكوسامين UDP-N –acetyle-glucosamine (GlcNAc) إلى UDP-N-MurNAc. (B) تعطيل نشاط ميور أ بواسطة المضاد الحيوي فوسفوميسين (fosfomycin).

يقوم ميور E,D,C بتفاعلات مشابهة وتنتمي لنفس العائلة الفائقة (فان هيجينوورت van Heijenoort, 2001a)؛ لأنها تصنع بالتتابع روابط أميد (amid bonds) مضيفةً L-Ala,D-Glu, and *meso*-DAP ليسين (Lysine) بدلاً من DAP في بعض البكتيريا الموجبة - لغرام) لسلسلة ميوراميل الناشئة، وينتج عن ذلك UDP ميوراميل ببتيد ثلاثي (الشكل ٣,٦) عند نهاية خطوة ميور E.

يصنع ميور D رابطة جاما- جلوتاميل البِبْتيد المتساوية (γ-glutamyl isopeptide bond) بدلاً من رابطة البِبْتيد القياسية إلى ألفا- كاربوكسيلات (α-carboxylate) D-Glu. تعتبر ATP هي المادة المشاركة المنشقة بواسطة كل من هذه

الإنزيمات الثلاث إلى ADP و Pi، مع وسيط من أسيل الفوسفات (acyle phosphates) كمانحات في خطوات تشكيل – الأميد لكل من الأحماض الأمينية الثلاثة (الشكل ٣,٧ A) وعلى سبيل المثال، يعتبر UDP - ميوراميل الفوسفات هو مختلط لا مائي (anhydride) المركب الوسيط المفترض المتولد في الموقع النشط لميور C وإستُوليَ عليه بواسطة L-Ala (الشكل ٣,٧ B). إن الأشعة السينية لتراكيب العديد من الأحماض الأمينية للإنزيمات الرابطة (الليغازات ligases) متاحة (فان هيجينورت van Heijenoort, 2001b) لتمكَن تصميم المثبط – المعتمد على التركيب، ولقد تم وصف مثبطات جزء من المليون (nanomolar inhibitors) لكل من ميور C (مارمور وآخرون Marmor *et al.*, 2001) وميور D (جيجناس وآخرون Gegnas *et al.*, 1998).

يكمل ميور F سلسلة البِبْتيديل الخماسية (pentapeptidyl chain) بإضافة البِبْتيد الثنائي D-Ala-D-Ala dipeptide كوحدة، ومرة أخرى يفلق ATP إلى ADP و P_i، ويتضمن افتراضياً UDP-muramyl tripeptidyl-phosphoric anhydride كوسيط (الشكل ٣,٧ C). ويُنهي هذا المرحلة السيتوبلازمية التقليدية المحددة لتجميع طبقة الببتيدوغليكان. تعتبر مثبطات أمينوألكيل فوسفينيت (aminoalkylphosphinate) لميور F ضعيفة (قيمة K_i من ٢٠٠ إلى ٧٠٠ ميكروميتر) ولكن قد تكون نقطة البداية للتحسين (ميلر وآخرون Miller *et al.*, 1998) لأدوية مرشحة أكثر – فعاليّة. لقد لاحظ تيكمان وآخرون (Teichmann *et al.*, 2001) أن كامل مجموعة إنزيمات مسار ميور ربما نشأت بواسطة الإزدواجية – الذاتية للجين (gene self-duplication).

الشكل (٣,٦). تحويل UDP-MurNAc إلى UDP-MurNAc tripeptide ثلاثي البِبْتيد بعمل ميور E ,D,C.

الشكل (٣,٧). (A) جيل الأمينو أسيل–فوسفات (aminoacyle-phosphate generation). (B) مثال ميور C مع UDP-MurNAc-P كرابطة وسيطة هوجمت بواسطة المادة المشاركة من المجموعة الأمينية L-Ala. (C) UDP-tripeptidyle acyl-P الوسيط في حفز ميور F: يهاجم بواسطة د– الآنين د– الآنين D-Ala- D-Ala.

الإنزيمات التي تحوّل ل–الآنين (L-Ala) إلى د– الآنين–د–الآنين (D-Ala-D-Ala):

راسيماز (racemase) ود–د– ليغاز (D-D-ligase)

يتوفرللمادة المشاركة د– الآنين–د– الآنين D-Ala-D-Ala لميور F زوج من الإنزيمات التي تعمل بالتتابع: الأول هو راسيماز الآنين alanine recemase، والثاني ليغاز د–الآنين د–الآنين D-alanyl-D-alanine ligase (الشكل ٣,٨ A). إنزيم راسيماز (racemase) هو حفّاز معتمد على – بيريدوكسال فوسفات (pyrodoxal phosphate –dependent catalyst) الذي يأخذ المستقلب الخلوي الطبيعي L-alanine ليحقق التوازن في شكله ليصنع د– الآنين D-Ala مع ثابت

التوازن ١ (equilibrium constant 1) (والش Walsh, 1988). يعتبر د–د ليغاز D,D-ligase الإنزيم الخامس في مسار ميور الذي يستهلك ATP لعمل رابطة الأميد، مع الانشقاق إلى ADP وأسَيل فوسفات (acyl phosphate)، وفي هذه الحالة يكون بالإمكان الاستحواذ على د–الانيل فوسفات D-alanyl- PO_3 بواسطة د–الآنين D-alanine الثاني (الشكل ٣,٨ B). الأشعة السينية للتراكيب متوفرة لكل من راسيماز (racemase) وليغاز (ligase) (فان وآخرون Fan *et al.*, 1994، شاو وآخرون Shaw *et al.*, 1997). يُثبط راسيماز بواسطة فوسفونيت التناظري ل– و د –الآنين و الآنين–فوسفات PO_3 L-and D-Ala,Ala-، الذي يُبشر كمضاد حيوي (تمت المراجعة بواسطة بج Bugg, ووالشWalsh, 1992، نيوهوس وهامس Neuhaus and Hammes, 1981)، ولكن المعدل العالي للطفرة (mutation) لأجهزة (نظم) النقل لامتصاص (قبض) Ala-P جعل البكتيريا مقاومة. يثبط كل من ليغاز د–الآنين د–الآنين وراسيماز (D-Ala- ligase and racemase D-Ala) بواسطة سيكلوسيرين (cycloserine) (نيوهوس وهامس Neuhaus and Hammes, 1981)، المركب الطبيعي، ولكن فعاليته ضعيفة وغير منتقاة نسبياً، ويحدث سمية. هذه الأمثلة قد تدل على أن جميع الإنزيمات الثمانية المذكورة أعلاه هي من حيث المبدأ أهداف جيدة لتطوير مضادّات حيوية جديدة. سوف نرجع لموضوع الإنزيم الرابط د–د– ليغاز (D-D-ligase) عند شرح مقاومة الفانكوميسين في الفصل العاشر وسنلاحظ أن مقاومة الغليكوببتيدات (glycopeptides) تتمركز حول خصوصية د–د–ليغاز (D-D- ligase).

الشكل (٣,٨). (A) العمل التتابعي لـ راسيماز الآنين alanine racemase وليغاز د–الآنين د–الآنين D-Ala-D-Ala ligase (DdI) لتوليد د–الآنين د–الآنين D-Ala-D-Ala. (B) D-Ala-P الوسيط في حفز DdI.

الإنزيمات التي توفر د– غلوتامات (D-glutamate) و*meso*-DAP لميور D وميور E

تم حديثاً مراجعة مسارات D-glutamate (فان هيجينوورت van Heijenoort, 2001b) ويشمل إما غلوتامات راسيماز (glutamate racemase) المشفرة بواسطة جين ميور I (*mur I* gene) وإما مسار إنزيم الحمض الأميني ناقلة

الأمين (D-amino acid transaminase pathway). في البكتيريا التي تستعمل طريق ميور *mur* I, I هو الجين الأساسي، وقد تم وصف إنزيم راسيماز (racemase) تركيبياً وآلياً بشكل جيد كراسيميز – مستقل عامل مساعد يعمل بواسطة الآلية – ذات القاعدتين. ولم يتم وصف مثبطات ذات نشاط مفيد مضاد للبكتيريا. في البكتيريا الموجبة – لغرام مثل العصيات (bacilli) التي تستخدم د–الآنين D-alanine كمانح إلى ألفا– كيتوغلوترات (α- ketoglutarate)، إنزيم (ناقلة الامين) (ترانساميناز) (transaminase) هو معتمد على بيريدوكسال فوسفات (PLP)، معروف التركيب ولكن لم يتم وصف اتجاهات المضاد البكتيري.

إن التكوين الحيوي لـ *meso-* DAP في البكتيريا السالبة – لغرام هو مسار متعدد الخطوات، ولقد وُصف آلياً وتركيبياً بشكل جيد مع الأشعة السينية لتراكيب كل إنزيم في المسار تقريباً (بورن وبلانكارد Born and Blanchard, 1999)، ولكن حتى الآن لم يتم العثور على مثبطات كعوامل فعالة مضادة للبكتيريا بواسطة التصميم أو المسح.

التصاق الدهن وإضافة السكر الثاني: وسائط الدهن ١ والدهن II وعمل راموبلانين (ramoplanin) وباستراسين (bacitracin)

إن الأغشية التي ترتبط بالمرحلة الثانية من تجميع ميورين تبدأ مع إنزيم MraY، الذي ينقل البِبْتيد المخموس لميوراميل (muramyl pentapeptide) من مثبته الذائب في الماء UDP water soluble anchor إلى مركب غشاء غير عادي C_{55} undecaprenyl phosphate الموجود على السطح السيتوبلازمي للغشاء. ويهاجم أكسجين الدهون الفوسفاتية lipid C_{55} phosphate oxygen رابطة بيروفوسفات الموجودة في شطر UDP، يطلق UDP وينتج جسر بيروفوسفات جديد بين الغشاء المرتبط بالدهن C_{55} وميوماريل خماسي البِبْتيد (الشكل ٣,٩A). ويعدُّ هذا وسيط الشحم الأول والمعروف بالدهن I (Lipid I). يسمى Mra Y كذلك ترانسلوكيز (translocase)، ولكن لا يوجد دليل تجريبي مباشر على أن سلسلة بِبْتيديل الخماسية (pentpeptidyl chain) تنتقل عند هذه الخطوة وفي الواقع، التحويل اللاحق للدهن I إلى الدهن II والذي تم شرحه أدناه يستخدم مادة سيتوبلازمية مشتركة، UDP-GlcNAc تتماشى مع الموقع النشط لـ MurG , MraY المتاح للوجه السيتوبلازمي للغشاء.

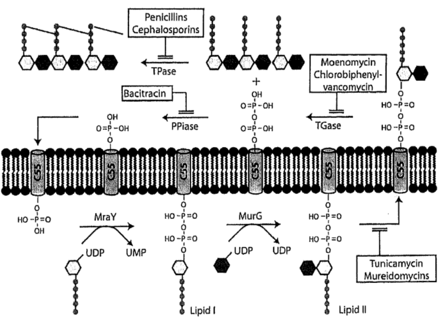
المنتجات الطبيعية التي تثبط عمل MraY تشمل ميوردوميسينات (mureidomycins A - F) (الشكل ٣,٩ B) (لي و هيكر Lee and Hecker, 1999)، ليبوسيدوميسينات (liposidomycins) وتونيكاميسين (tunicamycin)، وجميع مضادّات ببتيد اليوريديل (uridyl peptide antibiotics) التي يعتقد أنها تتنافس مع مادة UDP ميوراميل البِبْتيد الخماسية (UDP – muramyl pentapeptide) لأجل MraY. وبينما يثبط التونيكاميسين كذلك التكوين الحيوي لـ dolichol-PP- GlcNAc لسويات النواة في التكوين الحيوي للجليكوبروتين فإن ليبوسيدوميسين وميووريدوميسين هما مختاران لتثبيط MraY لبدائيات النواة (لي وهيكر Lee and Hecker, 1999). وقد يوفرا نقاط بداية لتطوير المضادّات الحيوي الشبه مُصنَعة.

وعند هذه النقطة يضاف السكر الثاني كمادة مشتركة إلى C_4-OH من مجموعة ميوراميل من الشحم I بواسطة الإنزيم MurG عبر UDP-GlcNAc. والناتج هو شحم – خماسي الببْتيد ثنائي السكريل (lipid-disaccharyl pentpeptide) المعروف بالشحم II (الشكل ٣,٩ A). إن ناقلة الغليكوزيل (MurG glycosyltransferase) مرتبط مع الغشاء ولكنه ليس مدفون فيه بعمق، فقد تم تذويبه، تنقيته وبلورته (ها وآخرون Ha *et al.*, 2000). وبسبب صعوبة الحصول على كميات من مواد ومنتجات MurG، فإن التقدم الذي تم إحرازه مؤخراً في تكوين كميات معقولة من المواد ونظيراتها قد ساهم في عمل كل من الفحص والكشف عن مثبطات (ها وآخرون Ha *et al.*, 1999، ليو وآخرون Liu *et al.*, 2001، من وآخرون Men *et al.*, 1998) وكما ذُكر أدناه يُقترح إيجاد آلية لعمل مضاد الغليكوببتيد الدهني رامبولانين (rampolanin).

الشكل (٣,٩). (A) التكوين الإنزيمي لوسائط الدهن I, II في مرحلة الغشاء لتجميع الببتيدوغليكان. (B) مثبطات ببتيد – النيوكليوسيد لـ MraY.

النقل والتفاعلات خارج الخلية لاستكمال بناء وتجميع وحدة الببتيدوغليكان

تبعاً لتكوينه بواسطة MurG، ينتقل الدهن II من الوجه الداخلي للغشاء السيتوبلازمي إلى الجِبِّلة / الوجه الخارجي. ولا يتوفر إلى الآن دليل نهائي أو إيضاح عن وجود بروتين ناقل (translocase protein). وبمجرد أن تواجه الخارج وربما تربط على سطح الغشاء بواسطة ذيل الدهن C_{55}، تصبح وحدة خماسية البِبْتيد أحادية السكريل مادة لـ transglycosylases and transpeptidases والتي ترتبط كذلك بالغشاء (الشكل ٣,٣). يوجد العديد من transglycosylases (أربعة معروفة في مجين الإشريكية القولونية واثنان في مجينات المكورة العنقودية الذهبية والمكورة العقدية الرئوية) والعديد من transpeptidases. والبعض منها ذات وظيفة ثنائية مع حقول transglycoslyase and transpeptidase منفصلة (سبرات Spratt, 1994)، كما أن الأغشية لهذا الفرع تعتبر ذات أهمية لأهداف قتل لمضادّات البيتالاكتام الحيوية، كما سيلاحظ أدناه. إن أنشطة transglycosylase تفلق رابطة muramyl-C_1-O-PO_3 بواسطة مهاجمة 4'-OH للشطر النهائي لـ GlcNAc التابع لسلسلة جليكان الممدودة في طبقة PG على وحدة PG ليتم دمجها (الشكل ٣,٣)، لتطلق C_{55} بيروفوسفات الدهن ولإعادة تدوير حامل الدهن C_{55} إلى الوجه السيتوبلازمي للغشاء، يجب أن تحلل وصلة البيروفوسفات التابعة لدهن البيروفوسفات C_{55} إلى بداية دهن الفوسفات C_{55} بواسطة إنزيم الفوسفات (phosphatase) المرتبط بالغشاء. وبعد ذلك بالإمكان توفر دهن الفوسفات C_{55} لجولة أخرى من تكوين الدهنI، التحويل إلى الدهن II، وتغيير الموقع (الشكل ٣,١٠).



الشكل (٣,١٠). دورة حامل الدهن في تجميع الببتيدوغليكان **TGase, transglycosylase; PPiase, pyrophosphatase.**

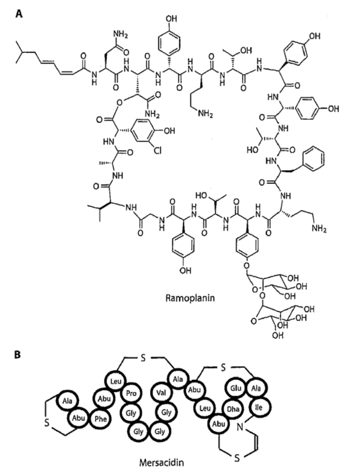
إن دورة ناقل الدهن حساسة عند عدة نقاط للتثبيط بواسطة المضادّات الحيوية. ولقد أظهر رامبولانين ليبوديبسيبيبْتيد الدوري (cyclic lipodepsipeptide rampolanin) (الشكل ٣,١١ A) في الدراسات في المختبر (لو وآخرون Lo *et al.*, 2000) أنه يرتبط مع كل من الدهن I والدهن II. إن تنحية الببتيدات الخماسية – الدهنية – السكرية (lipo-sugar-pentapeptides) بعيداً عن transglycosylases قد يعرقل النضج الإنزيمي اللاحق لوحدات الببتيدوغليكان. إن التركيب الثلاثي الأبعاد للراسب الدوري غير الريبوسومي (cycli 17-residue nonribosomal depsipeptide) قد تم تحديده بواسطة تصوير الرنين المغناطيسي النووي (nuclear magnetic resonance imaging) (كورز وجوبا Kurz and Guba, 1996) ويشبه ذلك الخاص بـ اللانتيبيوتيك ببتيد المرساسيدين (lantibiotic peptide mersacidin) (الشكل ٣,١١ ب) (ماك كافرتي وآخرون McCafferty *et al.*, 1999، بارش وآخرون Parsch *et al.*, 1997) والتي تكوِّن كذلك معقد مع الشحم II في ١ : ١ حسب العناصر المتفاعلة (stoichiometry)، وبذلك تثبط تكوين الببتيدوغليكان (بروتز وآخرون Brotz *et al.*, 1998). إن التفاصيل الجزيئية لتكوين معقّد (mersacidin complexation) مع الشحم II والتي لا تُعرف إلى الآن، بينما تم إحراز تقدم مع رامبولانين (كوديك وأتفوس Cudic and Otvos, 2002، كوديك وآخرون ٢٠٠٢). إن المرساسيدين (mersacidin) ومضادّات البِبْتيد الحيوية ذات العلاقة، أكتيجاردن (actigardin) (زيمرمان وجونج Zimmermann and Jung, 1997) هي مصنعة بواسطة الريبوسومات كسلائف بِبْتيدات غير فعالة، والتي من ثم يتم وصلها بعد الترجمة بواسطة أربعة جسور من methyle lanthionine thioether وأخيراً يتحلل البروتين لتطلق إشارة ببتيد (انظر الفصل السادس). البِبْتيد الناتج مؤلف من كريّات (globular)، وعالي القيد كما يعتقد أنه يتفاعل مع شطري سكر – بيروفوسفات والدهن من الدهن II. وقد تم وصف (بروكنك وآخرون، Breukink *et al.*, 1999) مضاد لآنتيبيوتيك نيسين – ز lantibiotic nisin Z بأنه يكوِّن كذلك مركب معقد مع الدهن II، إضافة أنها مكونة للمسامات. يحد الحجم الكبير (1.8 - 4.6 kDa) لـ lantibiotics مرورها خلال الأغشية الخارجية للكائنات السالبة – لغرام، والتي هي في المقام الأول فعالة في قتل البكتيريا الموجبة – لغرام (ساهل وبيربوم Sahl and Bierbaum, 1998).

يعترض مضاد البِبْتيد المُعشّر (decapeptide) غير الريبوسومي "الباستراسين" (الشكل ٣,١٢) كذلك دورة حامل الدهن C_{55}، عند مرحلة فوسفيت الدهن C_{55} (بروتز وآخرون Brotz *et al.*,1998)، مع احتمال عمل مركب معقد معتمد على الأيمون الموجب الشحنة (cation-dependent complexation) بين حلقة ثيازولين عند بقايا ٢ من الباستراسين وجزء الفوسفات من C_{55}-O-PO_3.

في الحالة الثابتة لا بد أن يكون هناك توازن بين حفَازات بلمرة البوليميرازات (polymerases) الببتيدوغليكان والإنزيمات الحالة للماء (هدرولاز) (hydrolases)، للسماح بالإدراج المنظم لوحدات جديدة من الببتيدوغليكان إلى الجدران الموجودة أثناء تكبير الببتيدوغليكان كلما نمت البكتيريا والشروع في تكوين الحاجز عند انقسام الخلية

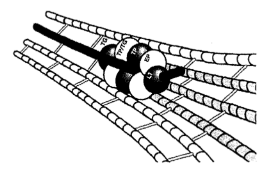
(هولتجي Holtje, 1998). وكما سيلاحظ أدناه، فإن transpeptidases التابعة لجدار الخلية (حافز بلمرة البيتيدوغليكان) (PG polymerases) يتم تأسيلها تساهمياً (covalently acylated) بواسطة مضادّات البنسيلّين وقد تم تحديدها تاريخياً كبروتينات مرتبطة بالبنسيلّين (penicillin-binding proteins (PBP) . لقد تم وصف المركبات المعقدة بين البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين PBP1B عالية الوزن الجزيئ، lytic transglycosylase، MltA والبروتين الصقالة، MipA من الإشريكية القولونية ويعتقد أنها أجزاء أكبر من ماكينة البروتين المرتبطة بنمو شبكة البيتيدوغليكان وتعرف كذلك بالكُيَيس (sacculus) (هولتجي Holtje, 1998).

كما يُفترض بأن هذا المركب المعقد يحتوي على PBP2 وPBP3 اللازمين لعمل البِبْتيد ناقل البيبتيداز والبِبْتيداز الداخلي (transpeptidase وendopeptidase) في نمو سلسلة البيتيدوغليكان مع ملحقات لكل من الغشاء الخارجي (MltA) والغشاء الداخلي (PBP1B) (الشكل ٣,١٣).



الشكل (٣,١١). تراكيب اثنان من المضادّات الحيوية التي تكوّن المعقّد المتري (stoichiol metric complexes) مع الدهن II: (A) رامبولانين، (B) ميرساسيدين.

الشكل (٣,١٢). باستراسين ونموذج لتكوين معقد فوسفات الدهن C_{55} لعرقلة دورة الشحم.



الشكل (٣,١٣). رسم لمعقد متعدد الإنزيمات المشتمل في السير على طول صقالة الببتيدوغليكان أثناء عملية التطويل (elongation). TG, transglycosylase ترانسغليكوزيلاز، TP، transpeptidase ترانسببتيداز، ثنائي الوظيفة ترانسببتيداز / ترانسجليجوسيلاز TP/TG, bifunctional transpeptidase/ transglycosylase، البِبْتيداز الداخلي EP, endopeptidase، ترانسغليكوسيلاز الحال LT, lytic transglycosylase (مقتبسة بالإذن من هولتجي Holtje, 1998).

مضادّات بيتالاكتام الحيوية، بينيمات (penems)، سيفيمات (cephems)، كاربابينيمات (carbapenems)، ووفرة البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين (PBPs)

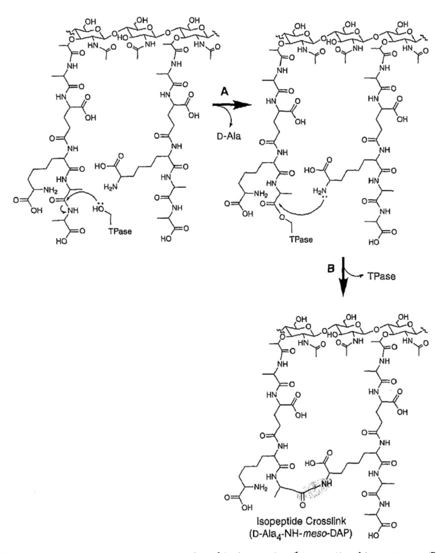
من أكثر المضادّات الحيوية شهرة والتي تقتل البكتيريا بواسطة تعطيل عملية نقل البِبْتيد الأساسية والتي ينتج عنها ميكانيكياً ببتيدوغليكان قوي من خلال وصلات تساهمية من خيوط البِبْتيد هي مضادّات البيتالاكتام الحيوية (الشكل ٣,١٤). وتشمل هذه أنواع البنسيلّين، حيث الرؤوس الحربية الكيميائية، حلقة البيتالاكتام رباعية العضوية تلتصق بنظام حلقة الكبريت خماسية العضوية، ومضادّات الكيفالورسبورين، حيث يلتصق البيتالاكتام إلى نظام الحلقة المطوّل (ring-expanded system) التي تحتوي على الكبريت. وتتحول مضادّات البنسيلّين إنزيمياً إلى مضادّات الكيفالوسبورين بواسطة نظام الحلقة المطوّل، كما سنلاحظ في الفصل الثالث عشر. وكلاهما نواتج استقلابات فطرية ثانوية، حيث تعتبرالمكنسية كريسوجينوم *(Penicillium chrysogenum)* كائن منتج مهم للبنسيلّين ذا نظام

الحلقتين وكذلك أكريمونيوم كريسوجينوم *(Acremonium chrysogenum)* لنواة الكيفالوسبورين (أوسوليفان وبول O'Sullivan and Ball, 1983). يعتبر العقار المضاد للبكتيريا الإميبينيم (imipenem) بديل طفيف للناتج الطبيعي للكاربابينيم (Carbapenem) (المثبط للبيتيداز الثنائي الكلوي)، ثيناميسين (thienamycin) (الشكل ٣,١٤) ويعطى مع سيلاستاتين (cilastatin) (renal dipeptidase) ليُحسِن الزمن العمري للكاربابينيم داخل الجسم بواسطة تعطيل التحلل المائي للبيتالكتام. لقد تم عزل الثيناميسين (thienamycin) بداية من بكتيريا المتسلسلة كاتليا *(Streptomyces cattleya)* (كاهان وآخرون Kahan *et al.*, 1979)، وتم عزل السلسلة الجانبية لحامض الكحول الزيتوني (chain alcohol olivanic epimeric side acid) من المتسلسلة فلافوجريسيس *(S.flavogriseus)*. إن أبسط كاربابينيم هو منظومة الحلقة الثنائية غير المستبدلة (unsubstituted bis ring system) مع ٢,٣ الرابطة المزدوجة التي تُنتج بواسطة البكتيريا إروينيا *(Erwinia)* المُمْرضة للنبات (انظر الفصل الحادي عشر) (بيكروفت وآخرون Bycroft *et al.*, 1988). يُعرف كذلك نوعان متغايران من المنتجات الطبيعية من البيتالاكتام: مونوباكتام (monobactams) ممثلة بواسطة النوكاردينز (nocardina) والأستيريونام المُصنع (synthetic aztreonam)، والكلافامات (clavams) ممثلاً بالكلافولانيت (clavulanate) والذي لا تعتبر بحد ذاتها مضادّات حيوية ولكن تعتمد على آلية المثبطات لإنزيمات للبيتالاكتاماز (تم شرحها في الفصل الثامن).

الشكل (٣,١٤). مضادّات البيتالاكتام الحيوية: (A) البنسيلّين، (B) الكيفالوسبورين، (C) كاربابينيم، (D) مونوباكتام، و(E) كلافانات.

ولفهم كيفية إبطال البنسيلّين للرابط – التبادلي للببتيدوغليكان للترانسببتيدازات (transpeptidases) ويتطلب تحليل موجز للآلية الحفَازة يتبعها مشابهات أشكال ترانسببتيداز (transpeptidase isoforms). وكما يدل اسم عائلة الإنزيم فإن خطوات الربط – التبادلي هي نقل البِبْتيد (transpeptidation) وبدون تكوين شبكة روابط البِبْتيد. وتتكون رابطة مشابهة للبِبْتيد (isopeptide bond) واحدة لايسين د–الآنين أو د ا ب–د الآنين Lys-D-Ala or DAP-D-Ala وتنفلق رابطة ببتيد واحدة د–الآنين د–الآنين D-Ala-D-Ala في كل دورة محفزة، وتطلق د–الآنين D-Ala حر (الشكل ٣,١٥) والذي يعاد تدويره إلى السيتوبلازم أو يتأكسد عند الغشاء السيتوبلازمي. لا يوجد متطلب لإدخال الطاقة وبحسب الحقيقة فإن هذه الإنزيمات تعمل خارج الخلية على الوجه السيتوبلازمي للغشاء حيث لا يوجد ATP وغيره من مصادر الطاقة بشكل روتيني. إن جميع ناقلات الببتيد (ترانسببتيدادات) (transpeptidases) هي متغايرات للموقع النشط لإنزيم سيرين الحالّة للماء (serine hydrolases) حيث يكون الموقع النشط سيرين أليف النواة (nucleophile) وتعمل سلسلة جانبية أخرى كقاعدة عامة (بوش ومباشري Bush and Mobashery, 1998). يتضمن النصف الأول من التفاعل الهجوم على الموقع النشط سيرين على رابطة الأميد (amide bond) التي تربط د–الآنين٤ مع د–الآنين٥ D-Ala$_4$ مع D-Ala$_5$.

ينتكس الهيدرال الرباعي (tetrahedreal) المقرَّب نحو إنزيم acyl-*O*-Ser مع إطلاق D-Ala$_5$ كحامض أميني حر. وللأسيل –او– ترانسببتيداز (acyl-*O*-transpeptidase) الوسيط جزء جليكان بِبْتيديل رباعي (glycan-tetrapeptidyl moiety) يعمل كمجموعة أسيل تيثيرد (acyl tethered group) مؤقتة (الشكل ٣,١٥A). وفي معظم أفراد عائلة إنزيم سيرين، يرتبط جزيء ماء بشكل منتج في الموقع النشط ويليه نقل الأسيل إعادة توليد شكل البداية للإنزيم لدورة محفزة أخرى. وهذا هو نهاية لأشكال البروتين المرتبط بالبنسيلّين PBP التي تعمل ككربوكسيل البِبْتيداز (D-,D-carboxypeptidases). ولكن في الببتيداز هذا يتم استبعاد الماء ويكون المكون الحركي أليف النواة الوحيد هو مجموعة الأمين لـ C_6 of DAP أو Lys$_3$ من سلسلة الببتيدوغليكان المجاورة. ويكمل نقل الأسيل إلى أليف النواة هذا في النصف الثاني من التفاعل (الشكل ٣,١٥ B) الدورة الحفَازة، وليعيد توليد الإنزيم الحر بمجرد إدخال رابطة البيبتيد المشابهة إلى الشبكة ليقوي الربط – التبادلي. ولقد تم إيضاح تراكيب الأشعة السينية للعديد من الحقول الحفَازة للترانسببتيداز (نوكس وآخرون Knox *et al.*, 1995، نوكس وآخرون Knox *et al.*, 1996، بيرس وآخرون Pares *et al.*, 1996) ودعم هذا المنظر الميكانيكي. في بعض البكتيريا الموجبة لصبغة غرام مثل المكورة العنقودية الذهبية، لا يحدث الربط – التبادلي بين سلاسل البِبْتيد مباشرة عن طريق ε-NH_2 التابعة لـلسلسلة الجانبية لـ Lys أو DAP ولكن تشمل جسور – ربط البيبتيد (peptide cross-bridges). يتم بناء جسر الجليسين الخماسي (pentaglycine bridge) (Gly$_5$) هذا على Lys قبل حدوث الربط التبادلي في المكورة العنقودية الذهبية. ومن ثم تتم عملية نقل الببتيد transpeptidation بين مجموعة NH_2 التابعة لـ Gly$_5$ وكربونيل D-Ala$_4$ carbonyl على سلسلة البِبْتيد المجاورة.



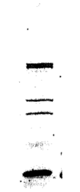
الشكل (٣,١٥). آلية تفاعل نقل البِبْتيد للببتيدوغليكان لبناء رابطة البِبْتيد المشابهة DAP-D-Ala isopeptide bond: إنزيم الأسيّل الوسيط في – نقل البِبْتيد. (A) تكوين إنزيم أسيّل، (B) إنزيم أسيّل لنزع وأسر الأسيّل (acyl enzyme deacylation and capture) بواسطة الأمين أليف النواة للسلسلة المجاورة.

يقتل الترانسببْتيداز نفسه عندما يبدأ الدورة الحفَازة مع مضادّات البيتالاكتام الحيوية كمواد حيث يتم الخلط بينها كسلسلة ببتيدوغليكان تنتهي في D-Ala-D-Ala ولم يتم الربط – التبادلي لها. يتم إضافة الموقع النشط – سيرين إلى كربونيل لكتام ذا الحلقات الأربع النقية (four-ring lactam carbonyl) (الشكل ٣,١٦) ويولد إنزيم أسيل الوسيط حيث تم فتح حلقة البيتالاكتام. والآن يحصل حجز للإنزيم في منتصف الدورة المحفزة. إن إنزيمات الترانسببتيداز (transpeptidases) صممت لاستبعاد الماء من وقف وسائط إنزيم الأسيل الطبيعية وبشكل مماثل، فإن التحلل المائي لأشكال إنزيم بنسيلويل (penicilloyl) يتم ببطء شديد (نصف الأعمار من عدة ساعات إلى أيام). ويصبح الإنزيم

ككومة من إنزيم بنسيلويل متكافئاً ويموت بشكل فعال إلى أن يسمح التحلل المائي البطيء لها باسترداد عافيته. وكما سنلاحظ في الفصل الثامن بأن أزمنة العمر الطويل لتراكيب وسائط إنزيم أسيل المتغيرة هي المسئولة عن قتل البكتيريا بواسطة البيتالاكتام.

الشكل (٣,١٦). رد فعل البنسيلّين كمادة إنتحار لترانسبيتيداز الببتيدوغليكان.

بواسطة أنواع البنسيلّين والكيفالوسبورين المشعة أصبح من السهل عرض أسيل ترانسببتيداز (acyl ترانسبيْتيدازات طويلة العمر الموسَّمة بشكل تكافئي بواسطة الرحلان الكهربائي لهلام سلفات الصوديوم دوديسيل (sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis) الذي حللّ البروتينات المحرَّفة (غير الطبيعية) بواسطة الحجم. عادة ما تظهر البكتيريا زُمر (رباط) متعدِّدة للبروتينات الموسَّمة (الشكل ٣.١٧) والتي يوجد منها أربعة في المكورة العقدية الرئوية *(S.pneumoniae)* وتصل إلى ثمانية في الإشريكية القولونية (دينوم وآخرون Denome *et al.*, 1999، سبرات Spratt, 1977). وقد أعطى هذا النهج الدليل التاريخي الأول لإنزيمات الترانسببتيدازالمتعدِّدة وأسس المخزون المحفز الكامل لعوائل هذه الإنزيمات. وبعد ذلك كان من الممكن تحديد كل بروتين مرتبط بالبنسيلّين (PBP) موسم وأخيرا إثبات نشاطه الإنزيمي بعد إنزيمات البنسيلويل التي تحللت. تتجه البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين ذات الوزن الجزيئي المنخفض إلى أن تصبح N-acyle-D-Ala$_4$-D-Ala$_5$ carboxypeptidases, hydrolases والتي تولد ينابيع من الببْتيد الرباعي (tetrapeptide stems) ذا الربط غير – التبادلي، في حين أن البروتينات ذات الوزن الجزيئي العالي المرتبطة بالبنسيلّين (PBP1A ,B and C) هي إنزيمات / transglycosylases ترانسبيْتيدازات ثنائية الوظيفة (هولتجي Holtje, 1998، شيفر وهولتجي Schiffer and Holtje, 1999). وبإمكان تحليل الطفرات الوراثية أن يحدد أي من البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين التي تمثل الأهداف الرئيسة للمضادّات الحيوية الخاصة وتحدد أدوارها الفسيولوجية في نضج وتجمع الببتيدوغليكان (ومن الأمثلة الحديثة في المكورة العقدية الرئوية، انظر بيك وآخرون Paik *et al.*, 1999). تستطيع مختلف مضادّات بيتالاكتام المختلفة حث التغيرات الخاصة في النمط الظاهري، مثال ذلك السلاسل الطويلة والمظاهر المستديرة، التي تعكس العرقلة التفضيلية لمجموعة فرعية (subset) من البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين (جرينوود Greenwood, 2000). أما عن الطفرات لمقاومة البنسيلّين فقد تكون كذلك مرتبطة بانخفاض المجاذبة (affinity) لبروتين مرتبط بالبنسيلّين محدد لمضاد بيتالاكتام خاص، وقد ساعد هذا إلى حد ما في تحديد الدور الفسيولوجي للبروتينات المرتبطة بالبنسيلّين.



الشكل (٣,١٧). البروتينات المرتبطة بالبنسلّين المتعدّدة في الإشريكية القولونية: رسومات بالتصوير الذاتي الشعاعي (autoradiographs) لبروتينات ¹⁴C-pencilloyl-proteins من الإشريكية القولونية فُصلت على هلام الرحلان الكهربائي. (بالإذن من دوتريتي وآخرون، ١٩٩٦).

في الإشريكية القولونية، عندما تُثبط كل من الأشكال المشابهة ثنائية الوظيفة للـ transpeptidases / transglycosylase مثال ذلك PBP1A and 1B isoforms، بواسطة الأسَلَة (acylation) مع الكيفالوسبورين كيفالوريدين (cephaloridine) فإن ذلك يؤدي إلى تكوين الكورات (spheroplast) والتحلل السريع. ومن الواضح أنها أهداف رئيسة للقتل لمضادّات البيتالاكتام الحيوية. إن التثبيط الإنتقائي لـ PBP2 بواسطة الأسَلة بالتراكيز المنخفضة بالبنسلّين ميسلينام (mecillinam) ينتج أشكال كروية، ثبات أوزموزي (نضح) نسبي، وتحلل بطيء. كما أن التراكيز المنخفضة لبنسيلّين G تأسّل PBP3 أولاً مولدةً سلاسل من البكتيريا في شكل خيوط. ومن غير الواضح ما إذا كان لـ PBP3 أهمية كبيرةً لمضادّات البيتالاكتام الحيوية. وعند مستويات عالية من بنسيلّين G، يحدث تأسّل وتحلل للأشكال المشابهة لـ PBP1. كما أعطى التقدير الكمي من البنسيلّين الموسَم المرتبط نحو ٢٥٠٠ جزيء من PBP لكل خلية من الإشريكية القولونية (دوترتي وآخرون Daugherty *et al.*, 1996)، مع نحو ٢٢٠ جزيء PBP1 و١٢٥ جزيء PBP1B كأهداف قتل رئيسة ونحو ١٥٠٠ (ثلثين من المجموع) PBP4-7 ذا الوزن الجزيئي المنخفض، والتي لا تعتبر أهداف للقتل (شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000).

كيف تُترجم أسَلة وتثبيط البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين بواسطة مضادّات البيتالاكتام الحيوية إلى تدهور لجدار الخلية وموت الخلية بواسطة النشاط غير الملائم أو الزائد للإنزيم المذوِّب (hydrolase) قد تم تحت الدراسة لعقود (انظر بيليس Bayles, 2000). أحد الفرضيات الحالية هي أن الإنزيمات المذوِّبة (hydrolases) عادة ما تكون مقيدة في وصولها إلى مواد الببتيدوغليكان وأن المضاد الحيوي يشجع التقسيم ناقص القسمة (oligomerization) لبعض البروتينات، مشكلاً قنوات في الغشاء السيتوبلازمي ليسمح بمرور الإنزيمات الحالة للببتيدوغليكان لتصل لموادها. في عداوى العاثية (bacteriophage λ) من الإشريكية القولونية توجد قناة البروتينات مثل الهولينات ومضادّات الهولينات (holins and antiholins) (يونج وآخرون Young *et al.*, 2000) التي تتحكم في وقت وصول الإنزيم المذوِّب

للميورين – والمشفَر بالعاثية (bacteriophage-encoded murein hydrolases) إلى الببتيدوغليكان. وقد يكون هذا بمثابة سابقة لعمل أنظمة الهولين – ومضاد الهولين ذا العلاقة (holin -antiholin systems) في الكائنات مثال المكورة العنقودية الذهبية (بيليس Bayles, 2000).

تعديلات السلسلة الجانبية (side chain modifications) في أنواع البنسيلّين

السلسلة الجانبية الطبيعية في الناتج الطبيعي الأولي لمضادّات البيتالاكتام الحيوية بعد دوران التكوين الحيوي (biosynthetic cyclization) (الفصل الثالث عشر) هي لـ– أمينوأديبويل (L-aminoadipoyl) (الشكل ٣,١٣). ومن ثم هذه يتم تقسيم فوقي (epimerized) إلى الشكل– د (D-form) ويولد موسع –الحلقة ديوكسيجينيز (ring –expanding dioxygenase) مضادّات الكيفالوسبورين مع أوليفين (olefin) في الست حلقات ونفس السلسلة الجانبية D-adipoyl يليها hydroxylation وأستلة (acetylation) عند C_3 لتعطي كيفالوسبورين C (أوسوليفان وبول ,O'Sullivan and Ball 1983). كما حاول الكيميائيون الصيادلة توسعة نطاق النشاط المضاد للبكتيريا لأنواع البيتالاكتام الأصلية لاكتساب القوة ومكافحة تَطوُّر المقاومة (شُرحت في الفصل الثامن) فقد عملوا الكثير من متغيرات السلسلة الجانبية بواسطة التعديل الشبه – اصطناعي ، مستعملين ٦– حامض الأمينوبنيسيلانك المنزوع الأسيل أو ٧– أمينوسيفيم (deacylated 6- aminopenicillanic acid or 7- aminocephem) لإعادة الأسْلة (reacylation) مع مجموعة منوعة من أنواع مختلفة من السلاسل الجانبية ، والمسح للحصول على النشاط الأمثل المنشود.

وقد أدى ذلك إلى موجات متعددة من بيتالاكتاماز الشبه مصنّعة على مدى ٥٠ عاماً من الاستعمال السريري ، لاحظ شولار وبرات (Scholar and Pratt,2000) خمس أصناف من البنسيلّينات (الشكل A ٣,١٨) معتمداً على أنشطة المدى الضيق مقابل المدى الواسع وعن إمكانية وجود نشاط مضاد للزائفات ، السلاسل الجانبية المصنعّة الأولى ، فينيل أستيل في بنسيلّين G وفينوكسي أستيل في بنسيلّين V ، أنتجت أدوية ضعيفة المدى ، ونشطة على سبيل المثال ، ضد المكورات العقدية والنيسرية ، وكانت حساسة لبيتالاكتاماز. استبدال مجموعات أريّل غير المستبدلة بمستبدلات ٢,٦ داي مثيوكسي في المثيسيلين (methicillin) ، وجزء نفثيل (napthyl) في نافسلين (nafcillin) ، ومجموعة فينيل أوكسازوايل (phenyloxazolyl) في اوكساسيلين (oxacillin) أنشأ إختلالاً في المواقع النشطة للبيتالاكتاماز وترتب على ذلك مقاومة التحلل. وعلى سبيل المثال ، مع البيتالاكتاماز من المكورة العنقودية الذهبية كانت قيم K_m لتحلل البنسيلّين G وبنسيلّين V في حدود ٢ – ٤ ميكروميتر ، بينما رفعت مجموعات دايميثوكسي في المشسيلين قيمة K_m من ١٠[٤] إلى ٢٨٠٠٠ ميكروميتر (نوفيك Novick, 1962) مما جعل المثسيلين نافعاً ضد العداوى المكوراتية. وقد نتج مدى نشاط أوسع عندما تم تحويل سلسلة فينيل أستيل (phenylacetyl) الجانبية إلى سلسلة جليسيل الفينيل (phenylglycyl chain) عن طريق إدخال مجموعة أمينو (amino group) (أمبسيلين ampicillin) أو عن بواسطة *p*-OH-phenylglycyl الخاصة بالأموكسيسلين (amoxicillin) مولدة أنواع بنسيلّين فموية وفعالة مع توافر حيوي (bioavailability) جيد.

A

الفئة		R	الخاصية
١- ضيق المدى	بنسيلّين G		ضعيف الثبات للحامض
حساس للبنسليناز (Penicillinase sensitive)	بنسيلّين V		جيد الثبات للحامض
٢- ضيق المدى	ميثيسلين		مقاوم للبنسيلّينيز بسبب ضخامة السلسلة الجانبية
مقاوم للبنسيلّين	أوكساسيلين		
٣- أمينوبنسيلّينات واسعة المدى	أمبيسلين		نشط فموياً، حساس للبنسيلّينيز، نشط ضد المستدمية النزلية والإشريكية القولونية
	أموكسيسيلين		
٤- مضاد للزائفة واسعة المدى	كاربنسيلّين		يعطى داخل الوريد، نشط ضد الزائفة الزنجارية
	تيكارسيلين		
٥- ممتد المدى	بيراسيلين		نشط ضد الزائفة الزنجارية. زيادة النشاط زائد ضد الأمعائيات

B

الفئة		R1	R2
١- الجيل الأول	كيفالوثين		
	كيفازولين		
٢- الجيل الثاني	كيفامندول		
	سيفيوروكسيم		
	سيفوكستين		
٣- الجيل الثالث	سيفوتاكسيم		
	سيفتريكسون		
	سيفتازديم		
٤- الجيل الرابع	كيفيبيم		

الشكل (٣,١٨). الأجيال المختلفة من (A) البنسيلّين و(B) الكيفالوسبورين. (مقتبسة بالإذن من شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000).

إن أنواع أمينو بنسيلّينات (aminopenicillins) هذه نشطة ضد البكتيريا السالبة – لغرام مثل الإشريكية القولونية والمستدمية النزلية *(Haemophilus influenzae)*. وللحصول على نشاط مضاد للزائفة يتطلب زيادة الاختراق خلال المسامات التقيدية للأغشية الخارجية للزائفات، وأدى المزيد من التعديلات على السلسلة الجانبية إلى تطوير أدوية مثل تيكارسلين (ticarcillin) مشتق إستر الكربوكسيل (carboxyl ester derivative) من سلسلة ثيازوليل (thiazolyl) الجانبية والتي تعتبر نشطة من خلال الطريق داخل العضل وداخل الوريد للاستعمال في المستشفى. وأخيراً وفي حالات تجرثم الدم بالزائفة الزنجارية في العداوى المستشفوية (في – المستشفى)، تعتبر مشتقات يوريدو (ureido) من الأمبسيلين مع مجموعة بيبرازينو (piperazino group)، بيبراسيلين (piperacillin)، بنسيلّين ممتد – المدى (extended – spectrum) ويعطى عن الطريق الوريدي.

تعديلات السلسلة الجانبية في مضادّات الكيفالوسبورين: أجيال متعدِّدة

تعتبر مضادّات الكيفالوسبورين من أكثر مضادّات البيتالاكتام التي توصف وأكبر الفئات مبيعاً. وقد أدت التعديلات في السلسلة الجانبية إلى الاختراق التفاضلي خلال المسامات (porins) في تراكيب غلاف الخلية إلى توفير خصائص مضادة للبكتيريا وحركات دوائية متنوعة (انظر شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000). يدرج الشكل (B ٣,١٨) أمثلة من الجيل الأول إلى الرابع من مضادّات الكيفالوسبورين. ويشمل الأمثلة على المدى – الضيق (الجيل الأول) الأدوية الفموية والوردية، مع الكيفالوثين (cephalothin) كنموذج. وللأدوية ضيقة – المدى النشاط الأفضل ضد المرضات الموجبة لغرام، ما عدا المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA)، وهي نشطة ضد بعض الكائنات السالبة – لغرام مثال الإشريكية القولونية وسلالات الكلبسيلة (Klebsiella starins). تعتبر مضادّات الكيفالوسبورين ممتدة – المدى (الجيل الثاني) ممثلةً بالأدوية الوريدية مثال سيفوكستين (cefoxitin) وكيفامندول (cefamandol) والأدوية الفموية مثال سيفاكلور (cefaclor) ولوراكارباسيف (loracarbacef)، إلى حد ما، أقل فعاليّة ضد المرضات الموجبة لغرام ولكن لها مدى – أوسع ضد المُمْرضات السالبة – لغرام ويشمل ذلك العصوانية الهشة *(Bacteroides fragilis)* والمستدمية النزلية. كما أن زيادة النشاط ضد السالبة – لغرام قد نبع من مجموعة مؤتلفة لأفضل اختراق، زيادة المجاذبة للارتباط بأهداف PBP، وخفض النشاط الحفّاز نحو التحلل بواسطة إنزيمات بيتالاكتاماز. إن السلاسل الجانبية في كل من مضادّات الكيفالوسبورين ضيقة – وومتدة المدى قد بني على الخبرة مع مضادّات البنسيلّين وتشمل السلاسل الجانبية للثيازوليل (thiazolyl) وفينيل جليسيل (phenylglycyl). إن السلاسل الجانبية لمضادّات الكيفالوسبورين واسعة وممتدة – المدى (الجيل الثاني – والثالث) عادة ما قدم زوج من جذوع المقاومة لإنزيمات البيتالاكتاماز، إضافة على أنها متباينة في البديل ٣ (3 substituent) على الهيدروكسيل التابع للحلقة السادسة. وفي مضادّات الكيفالوسبورين ذات المدى – الأوسع كان النشاط ضد البكتيريا السالبة لغرام

الأمثل وامتد ليغطي الزائفة الزنجارية بينما احتفظ بنشاط كاف ضد البكتيريا الموجبة – لغرام (مثال المكورة العنقودية الذهبية الحساسة للمثسيلين)، ما عدا السيفتازيديم (ceftazidime) (شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000) ذلك لأنها تعتبر مفيدة في التوقية الجراحية. أما جزيء الكيفالوسبورين من الجيل الرابع، سيفيبيم (cefepime)، تمت الموافقة على استعماله في الولايات المتحدة، وله خصائص أقرب إلى سيفيمات (cephems) واسع – المدى، ولكن يكتسب مقاومة متزايدة للعديد من البيتالاكتامات. السلاسل الجانبية المفضلة على البيتالاكتام في الجيل الثالث والرابع من مضادّات الكيفالوسبورين هي أمينوثيازول أوكسيمات (aminothiazole oximes)، والبعض منها له كاربوكسيلات مشحونة (charged carboxylates) (مثال، سيفتازيديم و سيفيكسيم) والتي تسمح بالاختراق الجيد خلال مسامات الأغشية الخارجية للبكتيريا السالبة – لغرام بينما تحافظ على المجاذبة العالية ضد أهداف البروتين المرتبط بالبنسيلّين PBP. وتختلف بدائل ٣ (3 substituents) على نطاق واسع، وبعضها يحتوي على أمينات (amines) موجبة الشحنة والتي تؤثر كذلك على النشاط الداخلي المضاد للبكتيريا والحركيات الدوائية والتوزيع. وعلى سبيل المثال، العديد منها يخترق السائل المخي الشوكي (cerebrospinal fluid) جيداً عندما تلتهب السحايا (شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000) ولذلك فهي فعالة لمعالجة التهاب السحايا.

عموماً، فإن المعالجة الشبه إصطناعية للسلاسل الجانبية للكيفالوسبورين قد أظهر القدرة المثلى ضد المجموعات الفرعية من المُمْرضات، وتمثلً الدورالمهيمن في العديد من العداوى حيث توصف مضادّات البيتالاكتام الحيوية. وللمضادّات الكيفالوسبورين جوانب ممتازة للسلامة، مما أدى إلى استخدامها على نطاق واسع في المستشفيات في كل من مجالات قبل الجراحة وبعد الجراحة. ومن جانب آخر، فإن نجاح مضادّات الكيفالوسبورين في نهاية المطاف قد تم انتقائه لأجل البكتيريا ذات محددات المقاومة (انظر الفصل السابع عشر).

كاربابينيمات ومونوباكتامات (carbapenems and monobactams)

هناك نوعان من الكاربابينيمات، إميبينيم وميروبينيم (imipeem and meropenem) تم اعتمادهما للاستخدام السريري في الولايات المتحدة، مع نوع ثالث، إرتابينيم (ertapenem) (MK-0826)، في التطوير السريري مع العزم على استخدامه كجرعة واحدة يومياً (انظر فوكس وآخرون Fuchs *et al.*, 2001). يعتبر الإميبينيم والميروبينيم ذوابان في الماء، ولهما إتاحة حيوية منخفضة كما أنهما يستخدما في المستشفى ضد الكائنات العدوائية المقاومة – للمضادّات الحيوية، حيث يُظهرا نشاطاً واسع – المدى (انظر الجدول ٤،٩ في شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000). كما أنهما يميلا لأن يكونا مقاومين لمعظم بيتالاكتامازات القائمة على سيرين (serine-based-β-lactamases) ولكنهما حساسين للتحلل بواسطة البيتالاكتامازات المعدنية (الفلزّية) (metallo-β-lactamases)، كما تم شرحه في الفصل الثامن. وعلى الرغم من أن إميبينيم مقاوم للتحلل المائي بالإنزيم البكتيري المتوسط بحلقة البيتالاكتام، إلا أنه في الفقاريات، يحلل

إنزيم الببتيداز منزوع الهيدريد ١ (dehydropeptidase I) اللاكتام في الخلايا الظهارة الكلوية (renal epithelial cells). سيلاستاتين (cilastatin) هو ببتيد منزوع الهيدريد (dehydropeptide) مشابه ذلك الذي يثبط الإنزيم الكلوي المذوِّب (renal hydrolase) وبذلك يُعطى مع الكاربابينيم. الميروبينيم مع بديل سي- ميثيل (C-methyl substituent) ليس حساساً للإنزيم الكلوي. ولإرتابينيم عمر – نصفي مطول مقارنة بأنواع الكاربابينيم السابقة، ربما بسبب الارتباط ببروتين المصل، كما اقترح استخدامها كجرعة – واحدة يومياً. ولكل من مضادّات الكاربابينيم نشاط مفيد ضد الزائفة (ليفرمور Livermore، وودفورد Woodford, 2000).

أحد مضادّات مونوبكتام، أزتريونام (aztreonam) (الشكل ٣،١٤)، وهو في الاستخدام السريري للإنسان. كما أن السلسلة الجانبية أسيل (acyl side chain) هي نفسها في سيفتازيديم، في حين أن الآكتام له بديل N – سلفونيت (N-sulfonate substituent) على الجانب الآخر. إن مدى النشاط المضاد للبكتيريا (شولار وبرات Scholar, and Pratt, 2000) هو أنه مفيد فقط ضد الممرضات السالبة – لغرام، مع نشاط جيد ضد الزائفة الزنجارية. ويبدو أن هدفه PBP3 عند تراكيز منخفضة كما أن له حساسية منخفضة لإنزيمات لكتاميز من مسببات الأمراض السالبة – لغرام.

توجد سقالة (هيكل) كلافام (clavam scaffold) في كلافولينيت (clavulanate) (الشكل ٣،١٣) (انظر كذلك الفصل الثالث عشر). ويعتبر كلافولينيت بحد ذاته مادة ضعيفة للبروتين المرتبط بالبنسيلّين (PBP) ولذلك لا يعتبر مضاداً حيوياً. وفائدته مستمدة من خواصه (كمادة انتحارية) (suicide substrate) مع إنزيمات البيتالاكتاماز، المزيد من الشرح في الفصل الثامن.

تعمل مضادّات الغليكوببتيد (glycopeptide) الحيوية بواسطة تكوين مركب معقد مع خيوط الببْتيد غير– الترابطية (un-cross-linked peptide) ويعرقل نقل الببْتيد

هناك نوعان من مضادّات الغليكوببتيد الحيوية في عائلة الفانكوميسين (vancomycin) تم التصديق عليها في الاستخدام السريري للإنسان، الفانكوميسين بحد ذاته (الشكل ٣،١٩) والتيكوبلانين (teicoplanin)، خارج الولايات المتحدة.

يختلف التيكوبلانين عن الفانكوميسين في ثلاث طرق: (أ) رقم الإرتباط بالغليكوزيل (glycosylation) والوضع (placement) متميزين، (ب) للتيكوبلانين سلسلة – طويلة للحامض الدهني البديل في رابطة الأميد (amide linkage) نحو سكر GlcNAc sugar المتصل بـ $pheGly_4$ و(ج) يختلف هيكل الببْتيد السباعي ذا الربط– التبادلي (cross –linked heptpeptide scaffold) عند رواسب ١ و٣ ليسمح لأربعة سلاسل جانبية للربط – التبادلي (١-٣،٢-٤ ، ٤-٦،٥-٧) مقارنة بالثلاثة في الفانكوميسين (انظر هوبارد وولش Hubbard and Walsh, 2002، ويليامز وباردسلي Williams and Bardsley, 1999، والمراجع فيها). وكما لوحظ في الفصل الثاني، فليس بإمكان الفانكوميسين

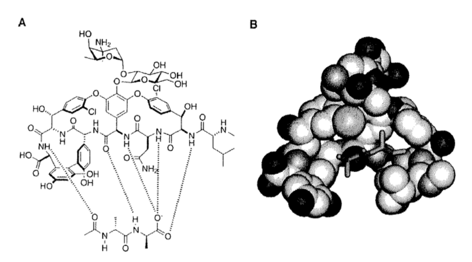
والتيكوبلانين اختراق المسامات في الغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لغرام وعليه فهما يقتصران على معالجة العداوى المهددة للحياة التي تسببها الممرضات الموجبة - لغرام مثل العداوى بالمكوراتية العنقودية، المكوراتية العقدية والمكوراتية المعوية.

الشكل (٣,١٩). تراكيب مضادّات الغليكوببتيد الحيوية، فانكوميسين وتيكوبلانين.

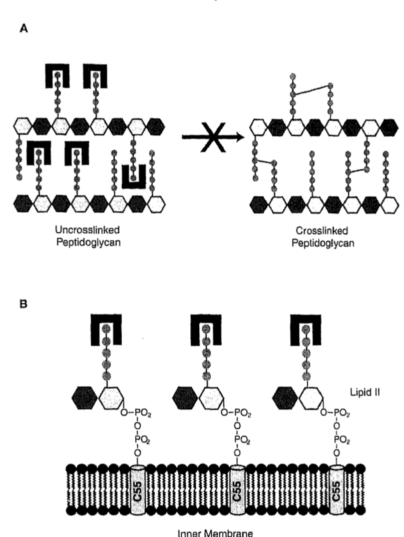
يعمل كل من هذين المضادين بدون تثبيط الـ ransglycosylases أو ترانسببتيداز transpeptidases بذاته، بل بواسطة تكوين معقد من وحدات مواد الببتيدوغليكان التي لها أذيال بِبْتيديل خماسية (pentpeptidyle tails) تنتهي في $D\text{-}Ala_4\text{-}D\text{-}Ala_5$. إن فصل المادة هذا يغلق بشكل فعال الـ نقل البِبْتيد وذلك بجعل N-acyl-D- Ala-D- Ala المستقبلة غير متواجدة لإنزيمات transpeptidases (الشكل ٣,٢٠). وفي هذا الاتجاه فإن فصل المادة هو مناظر للفصل المقترح للدهن II بواسطة رامبولانين (كذلك مضادّات غليكوببتيد الدهنية الحيوية (lipoglycopeptide antibiotics) (لو وآخرون Lo *et al.*, 2000). وقد تم وصف المعقد أولاً بواسطة NMR ومن ثمَّ بواسطة الأشعة السينية (انظر ويليامز وباردسلي Williams and Bardsley, 1999) ليشمل التعريف الجزيئي لنهايات N-acyl-D- Ala-D- Ala من خيط

الببْتيديل الخامس للببتيدوغليكان (PG-pentapeptidyl strand) التي لم يتم ربطها - تبادلياً بواسطة الجانب السفلي الصلب للفانكوميسين، على شكل - كأس وذلك عن طريق سلسلة من خمس روابط هيدروجين (انظر والش وآخرون Walsh *et al.*, 1996b ، ويليامز وبرادسلي Williams and Bardsley, 1999).

يُظهر نموذج ملء الفراغ الإغلاق المحكم الأمثل لملاءمة المضاد الحيوي لهدفه. ويوجد نوعان من وحدات الببتيدوغليكان، جزيئات الدهن II عند الوجه الجبلّي للغشاء، وكذلك الخيوط التي لم يتم ربطها - تبادلياً في الببتيدوغليكان المبلمر (polymerized PG) (الشكل ٣,٢١). وكذلك بإمكان الحصار (الإعاقة) التجسمي (steric blockade) لـ نقل الببْتيد أن يكون له تأثيرات على إنزيمات ناقلة الغليكوزيل (transglycosylases) وخاصة في البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين، ثنائية الوظيفة، وذات الوزن الجزيئي العالي. لمختلف أعضاء عائلة مضاد غليكوبتيد فانكوميسين نزعات متفاوتة للتقسيم الثنائي (dimerize)، وهذا قد يتيح تعزيز الطمع (avidity) نحو عمل مركب معقد (complexation) مع نهايات الببتيدوغليكان (ويليامز Williams, 1996). وسوف نعود لهذه الآليات في الفصل العاشر مع شرح للآليات الجزيئية لمقاومة مضادّات الغليكوببتيد الحيوية في نوع واحد من مسببات الأمراض الإنتهازية في الإنسان، المكورات المعوية المقاومة للفانكوميسين ((vancomycin-resistant enterococci (VRE)). وبالنظر إلى أن الفانكوميسين والبنسيلّين يعملان على جانبين مختلفين من الربط — التبادلي للببتيدوغليكان، فيمكن للمرء أن يتوقع، ويعمل، ويلاحظ التآزر للآثار المضادة للبكتيريا بالجمع بينهما.



الشكل (٣,٢٠). فصل نهايات PG-D-Ala-D-Ala بواسطة فانكوميسين. (A) خمس روابط (وصلات) بين المضاد الحيوي ونهاية الببتيدوغليكان، (B) نموذج— ملء الفضاء للمضاد الحيوي ونهاية الببتيدوغليكان.

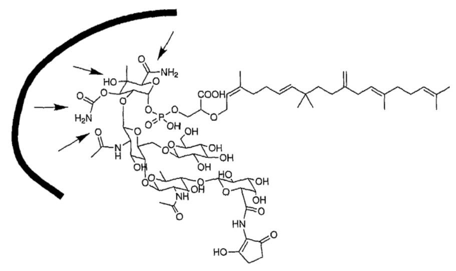


الشكل (٣،٢١). نهايات البيتيدوغليكان تتفاعل مع فانكوميسين وتيكوبلانين: (A) خيوط غير ذات ربط – تبادلي على البيتيدوغليكان السابقة الوجود، (B) مادة الدهن II قبل البلمرة إلى بِبّتيدوغليكان.

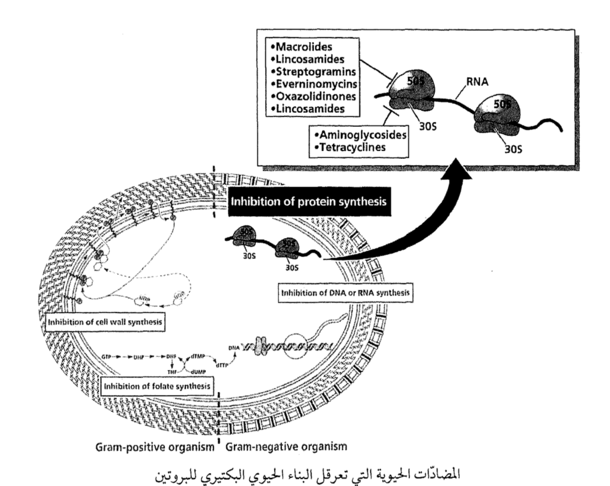
موإينوميسين (moenomycin) كمثبط لنشاط transglycosylase الخاص بالبروتين المرتبط بالبنسيلّين PBP1B

خلافاً للعديد من مضادّات البيتالاكتام الحيوية التي تثبط نشاط إنزيم البِبْتيداز للإنزيمات ثنائية الوظيفة transpeptidase / transglycocylase لأنشطة البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين ذات الوزن الجزيئي العالي، يوجد القليل جداً من منتجات المضادّات الحيوية الطبيعية التي تستهدف الموقع النشط لناقة الغليكوزيل transglycosylase. وموإينوميسين هو أحد هذه المركبات (الشكل ٣،٢٢)، الذي يستعمل كحفّاز للنمو في علف الحيوانات (ريتر وونج Ritter and Wong, 2001).

للموإينوميسين ٢٥-كربون دهن كحول، موإيسينول (25-carbon lipid alcohol, moecinol)، مرتبط عبر فوسفوجليسريت (phosphoglycerate) إلى ذيل السكريد الخماسي في رابطة فوسفيت ثنائي الإستر (phosphodiester linkage). وقد قدم تحليل NMR نموذج للتركيب ثلاثي الأبعاد مع مقترح بأن حلقات F و E لشطر الكربوهيدرات تتفاعل كمادة تناظرية، مع هدف إنزيم ناقلة الغليكوزيل (transglycosylase) لإغلاق إضافة وحدات خماسي الببْتيد ثنائي السكريل (disaccharyl pentpeptide) في طبقة نمو الببتيدوغليكان. ومن المحتمل أن يكون ذيل موإمينوميسين هو الغشاء المثبت الذي يعمل على تركيز المضاد الحيوي مسبقا عند الجانب الخارجي للغشاء السيتوبلازمي حيث توجد جزيئات إنزيم PBP1. تم صنع مكتبات من العنصر الأساسي ثنائي السكريدات، ولكن دون الاحتفاظ بنشاط مفيد حتى الآن (انظر ريتر وونج Ritter, and Wong, 2001).



الشكل (٣,٢٢). نموذج لتفاعل موإينوميسين (moenomycin) مع أهداف إنزيمات transglycosylases (بالإذن من كورز وآخرون Kurz *et al.*, 1998..



المضادّات الحيوية التي تعرقل البناء الحيوي البكتيري للبروتين

المضادّات الحيوية التي تعرقل البناء الحيوي البكتيري للبروتين
ANTIBIOTICS THAT BLOCK BACTERIAL PROTEIN BIOSYNTHESIS

يتناول هذا الفصل مختلف فئات المضادّات الحيوية التي تبذل عملها البكتيري المثبط أو البكتيري المبيد بواسطة عرقلة واحد أو أكثر من خطوات البناء الحيوي للبروتين الذي يحدث على الوحدات الفرعية 30S و 50S من ريبوسومات البكتيريا. يُظهِر الشكل على الصفحة المقابلة تكبيراً للأجزاء ذات العلاقة للشكل (٢،٢)، مشدداً على أن بعض المضادّات الحيوية تعرقل العمليات عند الريبوسوم 50S والبعض الآخر يعمل عند ريبوسوم 50S.

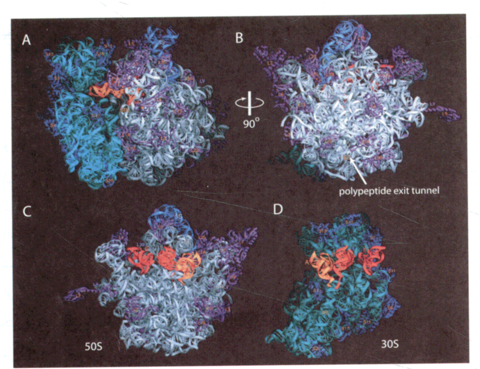
تركيب الريبوسوم البكتيري ودورة إنزيم الناقلة للبِبْتيديل (peptidyltransferase)

في ضوء مركزية البناء الحيوي للبروتين بالمقارنة بالوظيفة الخلوية والعدد الكبير من الخطوات التي يشملها، بدءاً من تفعيل ٢٠ موحودات (monomers) حامض أميني مولد للبروتين (proteinogenic) بواسطة إنزيم أمينو أسيل tRNA سنثيتازات (aminoacyl-tRNA synthetases)، إلى العديد من الخطوات لبدء السلسلة (chain initiation)، إطالة السلسلة (chain elongation) وإنهاء السلسلة (chain termination) للبِبْتيدات النامية على الريبوسوم، ومن الطبيعي أن عديداً من المنتجات الطبيعية من المضادّات الحيوية تستهدف واحدة أو أكثر من خطوات البناء الحيوي للبروتين. وقبل تحليل مواقع وآليات عمل المضادّات الحيوية المثبطة للريبوسوم، قُدم ملخص قصير عن الريبوسوم.

في البكتيريا، الريبوسوم عبارة عن وحدتين – فرعيتين من جسيمات البروتين النووي (nucleoprotein subunits)، يشكل الحمض النووي الريبي رنا حوالي الثلثين، بينما يشكل البروتين الثلث، من الوزن الجزيئي ٢،٥ – ٢،٦ MDa. وتحتوي الوحدة الفرعية الصغيرة، 30S على نحو ٢٠ بروتين وS16 ribosomal Rrna على نحو ١٥٠٠٠ ريبونيوكليوتيدات (ribonucleotides). وعادة ما يكون للوحدة الفرعية الكبيرة 50S نحو ٣٠ بروتين، ٢٣S rRNA نحو ٢٩٠٠ نيوكليوتيدات، و5S Rrna (١٢٢ نيوكليوتيدات). ويعتبر كل من rRNA الكبيرين المحتويين على حوالي ٤٥٠٠ نيوكليوتيدات سقالة ومحفز (catalyst) لتكوين رابطة البِبْتيد. وقد تم التبليغ عن تركيب الأشعة السينية

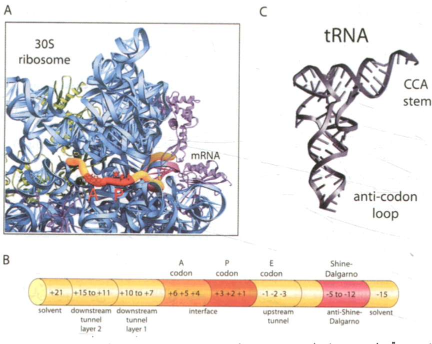
للريبوسوم 70S من البكتيريا ثيرمس أليفة الحرارة *(Thermus thermophilus)* عند تفريق (resolution) 5.5 Å، كافية لتكشف بناء الوحدات الفرعية لكل من 30S و 50S وتفاعلاتها (يوسبوف وآخرون Yusupov *et al.*, 2001) (اللوحة الملونة ٤,١). تُظهر اللوحة الملونة (٤,١ A) الوحدة الفرعية 30S على اليسار، الوحدة الفرعية 50S على اليمين و أمينو أسيل الحامض الريبي الناقل tRNA (aminoacyl-tRNA) في الوصلة (السطح البيني) (interface). ويبين الدوران عند ٩٠° في اللوحة الملونة (٤,١ B) المشهد من خلف الوحدة الفرعية 50S مع تحديد نفق خروج للسلسلة المتعدِّدة البِبْتيد (polypeptide) الناشئة. وتعطي اللوحة الملونة (٤,١ C) مشهد الوصلة للوحدة الفرعية 50C مع ثلاث tRNAs الذي يحتل المواقع P, A و E (انظر أسفل) وتبين اللوحة الملونة (٤,١ D)، الوصلة للمشهد المطابق للوحدة الفرعية 30S.

يكمل تركيب الأشعة – السينية للريبوسوم 70S التراكيب الحديثة للوحدة الفرعية 30S من نفس الكائن (ويمبرلي وآخرون Wimberly *et al.*, 2000)، المكررة إلى تفريق 3 Å، وتركيب الوحدة الفرعية 50S من هالوركيولاماريسمورتي *(Haloarcula marismortui)*(نيسين وآخرون Nissen *et al.*, 2000). لقد فتحت مجموعة التراكيب فصلاً جديداً في دراسة الريبوسومات كالآت مصنَّعة – للبروتين وكذلك آليات العرقلة بواسطة المضادّات الحيوية.



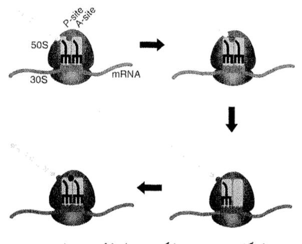
اللوحة الملونة (٤,١). تفاعل الوحدات الفرعية 50S, 30S وموقع tRNA في الموقع A والموقع P. (A) ريبوسوم الوحدة الفرعية 30S لأليفة الحرارة *T.thermophilus* يظهر على اليسار، والوحدة الفرعية 50S على اليمين. (B) دوران ٩٠° من (A) يظهر ظهرالوحدة الفرعية 50S وموقع نفق الخروج لسلسلة عديد البِبْتيد الناشئة. (C) منظر الوحدة الفرعية 50S من السطح الفاصل للوحدة الفرعية 50S/30S مع tRNA في المواقع P,E,A. (D) منظر للسطح الفاصل للوحدة الفرعية 30S. (بالإذن من يوسوبوف وآخرون Yusupov *et al.*, 2001).

إضافة إلى جزيئات 16S و 23S rRNA التي عناصر تركيبية، تميز وتحفيز هامة للريبوسوم، هناك جزيئين آخرين من رنا مطلوبين لتكوين البروتين وهما الرّنا المرسال mRNA والرّنا النقال tRNA. يوفر mRNA القالب الإرشادي، وقد تم حديثاً تصوير مساره عبر الريبوسوم بواسطة تحليل أشعة - إكس (انظر الاستعراضات في كولفر Culver, 2001، و يوسوبوفا وآخرون Yusupova *et al*., 2001). وتمتد خيوط mRNA خلال اثنين من الأنفاق في الوحدة الفرعية 30S مع امتداد قصير واحد فقط يبرز خلال الوصلة بين الوحدات الفرعية 30S و 50S (اللوحة الملونة ٤,٢ A). يحتوي امتداد mRNA على الستة النيوكليوتيدات التي تكوّن رامزات (codons) أمينوأسيل (A) aminoacyl وبيبتيد (P) peptidyl (اللوحة الملونة ٤,٢ B)، والنيوكليوتيدات +٦ إلى +١. يقع راموز موقع الخروج (exit site codon) (E)، عند القواعد -١ إلى -٣، في أعلى تيار النفق فقط أمام الموقع -٥ إلى -١٢، تسلسل شين- دالجرانو (the Shine-Dalgrano sequence) الذي يكوّن إقتران قاعدي (base pairs) مع مضادّات تتابع شين- دالجرانو عند نهاية '3 16S rRNA ليكوّن لفة حلزونية مزدوجة (double helix) التي تضع السجّل لترجمة mRNA. وتنقل جزيئات tRNA الأحماض الأمينية إلى الريبوزوم وتوفر مضاد الرامزة ثلاثية النيوكليوتيدات (anticodon trinucleotides) إلى واطسون كريك (Watson Crick) لتقترن قاعدياً مع المواقع A و B عند موقع التفاعل 30S-mRNA.



اللوحة الملونة (٤,٢). (A) تخيط mRNA في الموضع 30S نازع الرامز، (B) وضع روامز E,P,A لـــ mRNA في موقع نزع الرامز، (C) التصميم الهندسي لـــ tRNA يوضح عروة مضاد - الرامز التي تُعرف الروامز على mRNA وذيل CCA حيث يتم تشكيل الحمض الأميني تساهمياً وتنشيطه. (بالإذن من كولفر (٢٠٠١)).

تمتد النهاية الأمينية المؤسلة (aminoacylated end A, B) لـ mRNAs بعيداً عن الوحدة الفرعية 30S إلى الوحدة الفرعية 50S عند الحقل V لـ 23S Rrna. وتنتقل سلسلة البِبْتيديل إلى أمينو أسيل -tRNA في الموقع A بواسطة نشاط إنزيم ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) في كل حلقة تطويل- ببتيد- سلسلة للريبوسوم . ويشتق نشاط الببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) من نشاط ريبوزيم الحفّاز من هذا الجزء من 23S Rrna وبدون مساعدة ظاهرة من البروتينات (انظر نيسين وآخرون Nissen *et al.*, 2000) (الشكل ٤,١).

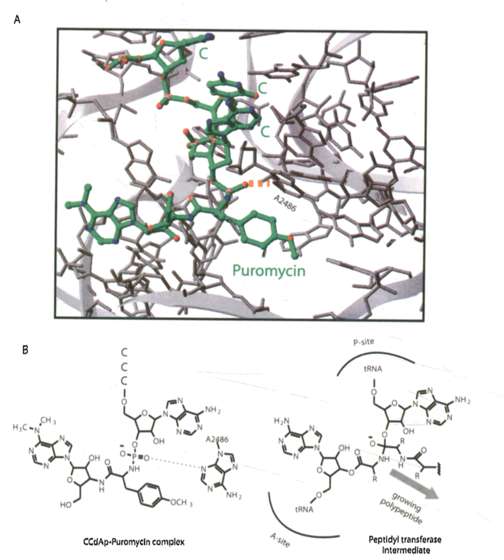


الشكل (٤,١). رسم لتكوين رابطة البِبْتيد عند الريبوسوم.

في كل حلقة حفّازة للتطويل، تشتغل الوحدة الفرعية 30S كوحدة مزيلة للراموز لتنتقي الأمينو أسيل المناسب مع مضاد الراموز التابع لها والتي سوف تناسب موقع A للراموز. وبمجرد أن يُرسخ أمينو أسيل-tRNA الصحيح في الموقع A فإن شطر أمينو أسيل يُشكل 75 Å بعيداً عند نهاية CCA لـ tRNA الموجه نحو البنية المنتجة لتهاجم سلسلة بِبْتيديل المجاورة، وبحد ذاتها هي موجهة نحو نهاية CCA التابعة tRNA الخاص بها، ولتطيل سلسلة البِبْتيدل النامية كلما انتقلت نحو مهاجمة مجموعة أمينو أسيل. وعند هذه الوصلة تعتبر هذه فارغة، tRNA منزوع الأسيل في الموقع P (الشكل ٤,١) وترتبط مجموعة الببتيديل مع tRNA الذي لا يزال مرسّخاً في الموقع A. ولدورة التطويل التالية، يتحرك tRNA منزوع الأسيل إلى الموقع E ,ويعاد موضع بِبْتيديل -tRNA نحو الموقع P، ويصبح الموقع A مفتوحا لإحضارٍ أمينو أسيل-tRNA التالية ليتم نزع الرامز بواسطة معقد 30S-mRNA complex. إن تناغم حركة mRNA لتقديم رامز ثلاثي جديد عند الموقع A عند السطح الفاصل بين 30S و50S ليسمح بنزع الرامز، وللثلاثة tRNA للتحرك بين المواقع P,E, وA لم يتم فهمه إلى الآن.

لقد تم تحديد مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) في الوحدة الفرعية 50S في الشطر V من 30S rRNA بواسطة التبلور المشترك (cocrystallization) لنظير حالة التحول، بِبْتيديل بيوروميسين فوفوناميديت (peptidyl puromycin

(phophonamidate) (اللوحة الملونة ٤،٣) والذي يشبه الركيب الهندسي الرباعي للوسيط في العملية الحفّازة للببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) رنا. وهذا يسمح بتعريف موقع A وموقع P لنيوكليوتيدات rRNA ذات العلاقة مع للنظير الرابط وقد تم اقتراح آليات لوظائف قواعد رنا الفردية في خطوات تكوين رابطة البِبْتيد (نيسين وآخرون Nissen *et al.*, 2000). وقد ساهم كذلك لتعريف نفق خروج عديد البِبْتيد، بطول حوالي Å ١٠٠، الذي يسمح بمرور سلسلة عديد البِبْتيد الناشئة خلال الوحدة الفرعية 50S إلى الخارج (اللوحة الملونة ٤،٤).



اللوحة الملونة (٤،٣). مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) على الوحدة الفرعية الريبوسومية 50S. (A) ترسيخ معقد بيوروميسين – CCdAp (CCdAp-puromycin complex) عند مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية 50S، (B) إرتسام ثنائي– الأبعاد لتفاعل CCdAp-puromycin مع A_{2486} والهندسة المشابهة للوسيط الرباعي أثناء تكوين رابطة البِبْتيد على نفس الموضع على الريبوسوم.

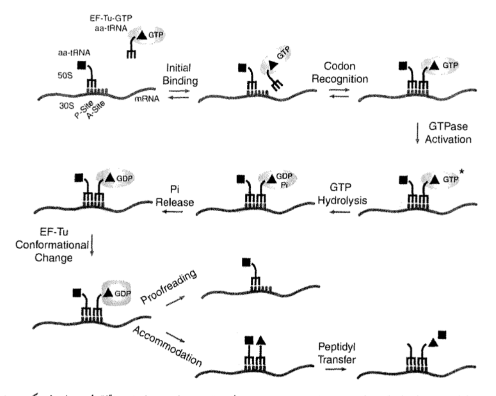


اللوحة الملونة (٤،٤). نفق خروج عديد البِبْتيد خلال الريبوسوم 50S.

ومن الواضح أن معدل الخطأ المنخفض الملاحظ في تكوين البروتين، حوالي خطأ واحد في ١٠^{٤} دورات تطويل، ويحتاج قراءة بينة وتنقيح للمحافظة على هذه الأمانة العالية أثناء اندماج الحمض الأميني في الريبوسوم (للمراجعة انظر رودنينا وونترمير Rodnina and Wintermeyer, 2001). وقد تراكمت الأدلة عبر السنين حول التمييز متعدد الخطوات بين أمينو أسيل-tRNA المتجانس (cognate aminoacyl-tRNA) في بحر من مجموعة أمينو أسيل-tRNA غير المتجانسة. وأُحضر أمينو أسيل tRNAs إلى الريبوسوم في معقد مع بروتين شابيرون (chaperone protein EF-Tu) الذي يعتبر إنزيم GTPase كامن. وبعد الربط الأولي مع الريبوسوم، يستطيع أمينو أسيل – tRNA إما أن يتفكك أو ان يتقدم ليقترن قاعدياً في مقابلة الرامزة – تفاعل رامزة الحِلزُ (anticodon-codon helix interaction)، مؤدياً إلى إعادة توجيه ومعقد طويل الأجل (الشكل ٤،٢). وعند هذه النقطة يتم تفعيل نشاط GTPase of EF-Tu ويرجح بواسطة تغييرتركيبي، ويحدث إنفلاق GDP ليربط GDP وP_i، يتبعه إطلاق الناتج P_i. ويظل GDP مرتبطاً ليعزز البنية النوعية لـ EF-Tu.GDP. وعندما يتم حدوث تكوين الرباط في مركز الوحدة الفرعية 50S، يتم إطلاق tRNA منزوع الأسيل من الموقع A بواسطة الشكل GDP التابع لـEF-Tu. ويرجح أن التراكيب الموضعية لـrRNA في الوحدة الفرعية 30S والوحدة الفرعية 50S تطلق إشارات بأن نزع رامز المعلومات قد تم وأن نهاية أمينو- أسيل التابعة لأمينيل-tRNA يجب أن توجه إنتاجياً لتكوين رابط البِبْتيد.

قد تقطع المضادّات الحيوية التوقيت والنوعية لأي من هذه الخطوات، ومن المحتمل أن مثل هذه التقطيعات تبطيء النمو و/ أو أن تكون قاتلة للبكتيريا. يظهر الشكل (٤،٣) أمثلة للأصناف الكبرى من المضادّات الحيوية المستهدفة للوحدة الفرعية 30S سبكتينوميسين (spectinomycin) الأمينوغليكوسيدات كاناميسين (kanamycin) وستربتوميسين (streptomycin)، تتراسيكلين (tetracycline) أو للوحدة الفرعية 50S (كلنداميسين) (clindamycin)، كلورامفينيكول (chloramphenicol)، لينيزوليد (linezolid) والميكروليدات مثل إريثروميسين (erythromycin)،

كلاريثروميسين (clarithromycin)، أزيثروميسين (azithromycin) وتيلوسين (tylosin). ولقد ظهرت في السنتين الماضيتين تراكيب المضادّات الحيوية المرتبطة بمواقع أهداف tRNA في الوحدة الفرعية 30S والوحدة الفرعية 50S (مثل، كارتر وآخرون Carter *et al.*, 2000، تشونزن وآخرون Schunzen *et al.*, 2001). وعلى سبيل المثال، فإن التبلور المشترك (cocrystallization) للمضادّات الحيوية الثلاثة باروموميسين (paromomycin)، سبكتينوميسين وستربتوميسين مع أهداف الوحدات الفرعية 30S، دل على تغيير التوازنات الرقيقة بين الحالات البنيوية لـrRNA، مؤدية إلى عرقلة نقل (translocation) (سبكتينوميسين)، نزع الرامز (باروموميسين)، والدقة الترجمية (translation) (ستربتوميسين) (كارتر وآخرون Carter *et al.*, 2000). ومن المحتمل أن يكون هذا العمل مبشراً للعديد من الدراسات القادمة والتي ستسلط الضوء على عمل المضادّات الحيوية في واحد أو أكثر من الخطوات التأسيسية في وظيفة الريبوسوم.



الشكل (٤,٢). الخطوات في الربط، تمييز الرامز، تفعيل GTPase، برهنة القراءة، ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) في تكوين رابطة الببْتيد (معدلة من رودنينا ووينترمير Rodnina and Wintermeyer, 2001).

A

Tetracycline

Spectinomycin

Kanamycin

R = NH-CNH-NH2
Streptomycin

B

R = H Erythromycin A
R = Me Clarithromycin

Azithromycin

Telithromycin

Linezolid

Tylosin

الشكل (٤,٣). تراكيب بعض المضادّات الحيوية التي تعمل عند (A) الوحدة الفرعية 30S أو (B) الوحدة الفرعية 50S للريبوسوم البكتيري.

صنف الإريثروميسين من مضادّات الميكروليد الحيوية

يعتبر الإريثروميسين العضوية-١٤ من الاكتون كبير الحلقة (14-membered macrocyclic lactone) وأنتج بوراسطة المتسلسلة سكروبوليسبورا إريثري (*streptomycete Saccharopolyspora erythraea*). ويظهر أجليكون (aglycone) من خط تجمع المطبّع (المؤثر النوعي) الإنزيم التركيبي عديد الكيتيد (modular polyketide synthase assembly line) ، كما سيتم فحصه في الفصل الثاني عشر، ومن ثم أكسجته ثنائياً (bis oxygented) وربطه بالغليكوزيل (bis glycosylated) لإنتاج المضاد الحيوي الفعال، العضوية-١٥ شبه الإصطناعي (أزيثروميسين)، والعضوية-١٦ الميكروليدات المنتجة طبيعياً مثل تيلوسين الفعالة كذلك (الشكل ٤٫٣). يعدُّ التصميم الهندسي للماكرولاكتون والتفاعلات مع السكريات المفتاح المحدد للربط والنوعية في التفاعلات مع 23S rRNA في الموقع ٦- نيوكليوتيد ٢٠٦٢-٢٠٥٨. وتعرقل ربط الإريثروميسين ترجمة عديد البِبْتيد مع الأثر النهائي إطلاق وسائط بِبْتيديل-tRNA (peptidyl-Trna) قبل الآوان بواسطة عرقلة الوصول إلى نفق خروج البِبْتيد المطوّل (بان وآخرون Ban *et al.*,2000، تشونزن وآخرون Schunzen *et al.*, 2001). ويعرقل الدواء كذلك تجمع الوحدات الفرعية 50S، والأرجح من خلال هذا التفاعل مع 23S rRNA. يبلغ ٥٠٪ من التركيز المثبط (IC_{50}) لمنع الترجمة في خلايا المكورة العنقودية الذهبية حوالي 0.2 µg/ml (جولدمان وآخرون Goldman *et al.*, 1999) ويبلغ K_d للقياس الكيميائي (stochiometric) للربط للعنصر مع مكونات 23S rRNA للوحدة الفرعية 50S حوالي 1Nm. وقد أثبت الإريثروميسين أنه آمن وفعال في البالغين والأطفال وقد تم استعماله في جميع حالات المرضى المنومين والمرضى غير المنومين.

الميكروليدات ممتدة - المدى مثل أزيثروميسين وكلاريثروميسين (الشكل ٤٫٣) ملئت مكاناً علاجياً مهماً لمعالجة العداوى التنفسية (تشولار وبرات Scholar, and Pratt, 2000). وتعتبر جزيئات شبه اصطناعية - كلاريثروميسين مع ميثوكسي (methoxy) عند C_6 وأزيثروميسين مع العضوية-١٥ ميكروليد الممتد والنيتروجين الذي تم إدخاله والذي له بنية ميكروليد محولة.

وللأزيثروميسين والكلاريثروميسين قيم IC_{50} تكاد تكون مكافئة للإريثروميسين (انظر تشامبنيس Champness, 2000، للمراجعة)، وتسبب تهيج أقل للجهاز المعدي المعوي، وأكثر ثبات لتركيز أيون الهيدروجين الحامض (PH) للمعدة، ونفاذ أفضل للأنسجة، وله نصف - أعمار أطول ليسمح بجرعات مرة واحدة أو اثنين في اليوم. تتطلب الميكروليدات الضيقة - والممتدة المدى سكر كالدينوس (caldinose sugar) لفعاليّة المضاد الحيوي.

مضادّات الميكروليد واسعة - المدى ذات 3-OH تتأكسد إلى كيتون، لتزيل موضع التصاق سكر كالدينوس، وتعرف بكيتوليدات (ketolides) (مثال، تليثروميسين telithromycin) (برونسون وبارت Brosnson and Barrett, 2000a)، وهو في المراحل الأخيرة من التَطوُّر السريري، وقد تمت المصادقة عليه في الولايات المتحدة الأمريكية. كما وأظهرت هذه الكيتوليدات حوالي ١- log تحسن في قيمة IC_{50} (0.02 to 0.04 µg/ml) (كابوبيانو وآخرون Capobiano *et al.*,

2000، دوثويت وآخرون Douthwaite *et al*., 2000) وهي لا تحفز ظهور الجين المقاوم الخاص بأمثلة rRNA (انظر الفصل العاشر). لقد أصبحت الأجيال المتتابعة من الميكروليدات الأكثر ملاءمة؛ بسبب تغيير الخواص وتشمل الثبات للحامض في المعدة والفعاليّة ضد الممرضات المقاومة للميكروليد (الفصلان التسع والعاشر). كما يجب أن تأخذ جميع هذه الأجيال فائدة الفروقات في البناء الهندسي في 23S RNA للريبوسومات البكتيرية مقارنة بسويات النواة لتسمح بالانتقائية لقتل البكتيريا. ويسلط التحليل الحديث بالأشعة السينية لمضادّات الميكروليد الحيوية المرتبطة بالريبوسومات (انظر أسفل) بعض الضوء على هذه الانتقائية. وقد تمت دراسة الأعضاء من هذا الصنف من الأدوية بشكل مكثف كأهداف لجيل متنوع بالتكوين الحيوي الاتحادي، كما سيتم شرحه في الفصل الخامس عشر.

التيلوسين، هو ذا عضوية-١٦ ميكروليد وله ٢ كربونات ماكرولاكتون أكبر من تلك التي في الإريثروميسين وكذلك سكريات مميزة، هدفها 23S rRNA عند نفس الموقع الأساسي ويستعمل في الطب البيطري. قد التحليل الحركي لربط كل من تيلوسين وإريثروميسين بالريبوسوم معقد تصادمي أولي (collisonal complex) تبعه خطوة تزامرية (isomerization step) بطيئة نتج عنها ربط محكم وتفكك بطيء. وسيكون الرجوع من المعقد المتزامر (isomerized RI*complex) بطيء جداً. وللتيلوسين كمثبط I، يتراكم معقد ريبوسوم *I على التصادمي RI بقدر 600/1.

ريبوسوم + I ↔ ريبوسوم I ↔ ريبوسوم *I.

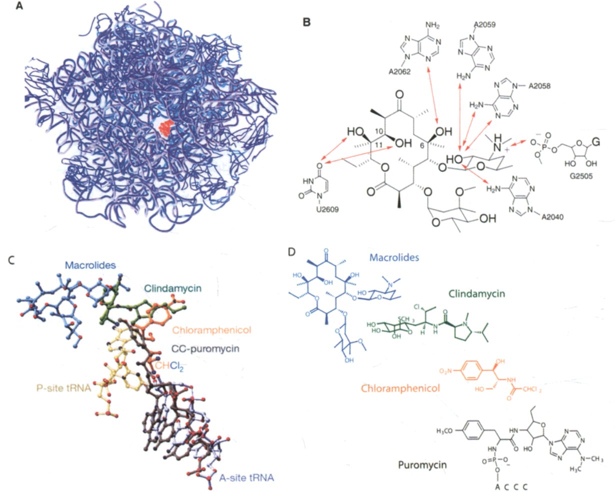
ولمعقد ريبوسوم – إريثروميسين * معدل يساوي ١٠/١، مشيراً إلى تثبيط أطول أجلاً لمعقد تيلوسين (دينوس Dinsos) (وكلباكسيس Kalpaxis, 2000). وفي المقايسة المباشرة لنشاط الإنزيم الحفّاز الناقل للبِبْتيداز (ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل))، لا يثبط الإلريثروميسين الفعاليّة بينما يثبطها التيلوسين. كما دل تحليل الأثر ان الإريثروميسين يرتبط بجوار مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) في 50S ويعرقل مرور سلسلة بِبْتيديل الناشئة إلى نفق الخروج من خلال الوحدة الفرعية 50S. وقد تمت حالياً المصادقة على ذلك بواسطة تحليل الأشعة السينية للميكروليدات المرتبطة بـ 23S rRNA في الوحدة الفرعية 50S للبكتيريا دينوكوكس راديوديورانس (*Deinococcus radiodurans*) (تشولنزن وآخرون Schlunzen *et al*., 2001).

الإريثروميسين ومضادّات الميكروليد العضوية-١٤ والكلاريثروميسين وروكسيثروميسين (roxithromycin) ممتدة المدى، ترتبط جميعها عند المدخل إلى نفق عديد البِبْتيد المُصدر (اللوحة الملونة ٤،٥ A)، لتسمح ببناء حوالي ستة إلى ثمانية من الرّنا النقال tRNA – قليل البِبْتيد-الرّنا النقال (oligopeptide –tRNA) قبل عرقلة عملية الإطالة وإنهائها قبل الأوان. للميكروليدات القصيرة والممتدة ثلاثة عناصر تركيبية – ماكرولاكتون، ديسوسامين (desosamine)، وسكريات كالدينوس، وهذه التجميعة تصنع إلى ٧ روابط هيدروجين مع 23S rRNA. ولا يوجد بروتين ريبوسومي في الاحتكاك الجزيئي مع مضادّات الميكروليد الحيوية. يصنع 2'-OH التابع للديسوسامين روابط هيدروجين إلى N_1 وN_6 من A_{2058} في 23S RNA (اللوحة الملونة ٤،٥ B)، مما يفسر الحاجة الأساسية لـ A_{2058} لتصبح حساسة

للميكروليدات (فيستر ودوثويت Vester and Douthwaite, 2001). في سويات النواة، يتغير A_{2058} إلى G_{2058} مما يفسر على الأقل جزءاً من انتقاء الهدف لصنف أدوية الإريثروميسين للريبوسومات البكتيرية (تشولنزن وآخرون Schlunzen *et al*, 2001). وقد تصنع البدائل 6-OH,11-OH and 12-OH على الماكرولاكتون أيضاً روابط هيدروجين ملامسة مع 23S RNA لتوجيه المضاد الحيوي. ولا تصنع حلقة كالدينوس تفاعلات مهمة وتُستبدل في الكيتوليدات واسعة – المدى مع استرجاع وحتى اكتساب الفعاليّة.

وعلى الرغم من أن الميكروليدات لا تعرقل خطوة تكوين- رابطة البِبْتيد مباشرة عند مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية 50S، إلا أنه من المعروف أنها تنافسية مع مضادّات لينكوسميد (lincosamide antibiotics) التي تعتبر مثبطات مباشرة لببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل). وفي الحقيقة فإن الطفرة الواحدة عند A_{2058} لأي من القواعد الثلاث الأخرى (G,C or U) تحفز مقاومة نشوء ثلاثية لأعضاء عائلة الميكروليدات، اللينكوسميدات، وستربتوجرامين ب (streptogramin B) (مقاومة MLS_B) مما يشير إلى تعارض فيزيائي (للمراجعة، انظر فيستر ودوثويت Vester and Douthwaite, 2001). ولقد قدم تشولنزن وآخرون Schlunzen *et al*., 2001 إثبات مباشر بواسطة التركيب البلوري المشارك لمضاد اللينكوسميد كلنداميسين (clindamycin) (اللوحة الملونة ٤,٥ C و٤,٥ D)، حيث مجموعات OH -'2 و'٣ لشطر السكر للمضاد الحيوي، يكوِّن روابط هيدروجين مع نفس المجموعة الأمينية خارجية الحلقة (exocyclic N_6 amino group of A_{2058}). والزيادة بربط كلنداميسين وربط الإريثروميسين أظهر تعارضاً فيزيائياً جزئياً (اللوحة الملونة ٤,٥ C). ولقد عرف الكلنداميسين بشكل منفصل أنه يتفاعل مع كل من الموقع A والموقع P لمركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل)، وهكذا فإن البناء النموذجي للنهايات '3 التابعة لـ A-and P- tRNA تنتج المركب في اللوحة الملونة C٤,٥ التي تظهر وضع كلنداميسين وإريثروميسين بالنسبة لـtRNA الاثنين اللذان يضعا البِبْتيديل المانح والأمينو- أسيل المستقبل في تكوين روابط البِبْتيد والتي تعتبر لب التفاعل للريبوسوم. وأخيراً، فإن مضاد الكلورامفينيكول (chloramphenicol) الآن تحت الاستعمال المحظور بسبب قضايا تتعلق بالسمية، وقد تم بلورته بالمشاركة مع الوحدة الفرعية 50S لبكتيريا دينوكوكس راديوديورانس بواسطة نفس فريق البحث هذا (تشولنزن وآخرون Schlunzen *et al*., 2001). ومن المعروف بأن الكلورامفينيكول يعرقل تفاعل أمينو-أسيل -tRNA مع الموقع A في مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) وهذا بالفعل الموقع حيث يرتبط الكلورامفينيكول.

إن موضع المضادّات الخمس في تجويف مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية 50S للريبوسوم البكتيري سوف بالتأكيد يساعد الجهود الجديدة في التصميم المنطقي للمضادّات البكتيرية التي تستهدف تكوين البروتين.



اللوحة الملونة (٤,٥). طريقة عمل مضادّات الميكروليد الحيوية: (A) ربط الميكروليد عند 50S عديد ببتيد نفق الخروج، (B) التفاعل مع قواعد 23S RNA، (C) التعارض مع مواقع الربط للكلنداميسين والكلورامفينيكول وكذلك الموقع -A والموقع – P لـــ tRNAs، (D) اكتشاف الجزيئات التي تتعارض في اللوحة جـــ. في المقايسة المباشرة لفعاليّة ببتيديل ترانسفيراز، لا يعرقل الإريثروميسين الفعاليّة.

(بالإذن من تشولنزن وآخرون Schlunzen *et al.*, 2001).

التجميعات التآزرية غير الريبوسومية للبِبْتيد: سينيرسيد (Synercid)

تصنع أنواع كبيرة من المتسلسلات والشعاعيات (streptomycetes and actinoplanes) (تشامبنيس Champness, 2000) زوج من المضادّات الحيوية من عائلة فيرجينياميسين (virginiamycin)، (تدعى كذلك برسيناميسين وستربتوميسين) (pristinamycin and streptomycin)، وتسمى مجموعة A ومجموعة B (باريز وآخرون Barriere *et al.*,1998) أو، بدلا عن ذلك مجموعة I ومجموعة II، التي تعمل تآزرياً لتعرقل ترجمة عديد البِبْتيد بواسطة الوحدة الفرعية 50S

للريبوسوم البكتيري عند المواقع 23S rRNA لتعارض جزئياً تلك المستهدفة بواسطة الميكروليدات. وسوف نستعمل عبارة برسيناميسين للزوج العلاجي الذي تمت المصادقة عليه بإسم سينيرسيد (ليفرمور Livermore, 2000) (الشكل ٤,٤) وعبارة الجنيس البديل فيرجينياميسين في الفصل الحادي عشر عند مناقشة قانون توقيت تصنيع المضاد الحيوي. تعتبرالمجموعة I لاكتونات ببتيد حلقية غير الريبوسومية مع سلسلة الكحول الجانبية N-aryl-Thr$_1$ المتصلة بكربونيل pheGly$_6$. والمجموعة II برستيناميسين هي هجين عديد الكيتيد (polyketide) / عديد البِبْتيد (polypeptide) مع شطر أوكساسول– برو (oxazole-pro) (مشتق من طليعة ser - pro dipeptide) ومطمورة في صلب عديد البِبْتيد (الفصل الثالث عشر). والبرستيناميسين II, I الخاص من تجميعة سينيرسيد هي تحويلات شبه مصطنعة، مع بديل ثيوإيثر (thioether) على فضالة ٤–أوكسوبيبيكوليل (4-0xopipecolyl residue) من كوينوبريستين (quinupristin) وثنائي إيثيل أمينو إيثيل سلفون البديل (diethylaminoethylsulfone substituent) على حلقة بروليل (prolyl ring) لمركب دافوبرستين (dalfopristin) (الشكل ٤,٤). وقد حسَّنت التعديلات الذوبان في الماء وسمحت بالقبول السريري للاستعمالات المعتدة لمعالجة عداوى المكوراتية المعوية المقاومة للفانكوميسين (VRE).

Pristinamycin I

Quinupristin

Pristinamycin IIA

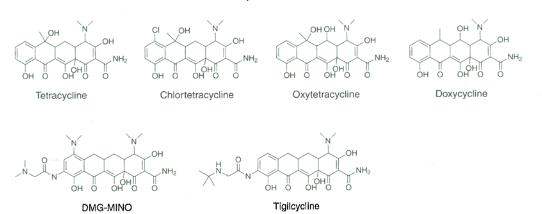
Dalfopristin

الشكل (٤,٤). تراكيب مركبات بريستيناميسين I (كوينوبروستين) و برستيناميسين IIA (دالفوبرستين) لمضاد البتيد الحيوي سينرسيد.

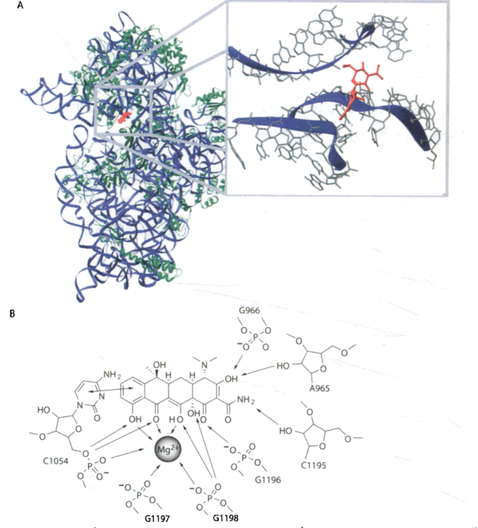
التتراسيكلينات وجليسيلسكلينات (Tetracycline and glycylcyclines)

لقد عرفت التتراسيكلينات منذ ١٩٤٨م مع اكتشاف كلورتتراسيكلين (chlortetracycline) ومن ثم تتراسيكلين من المتسلسلة ستربتوميسس أوريوفيسينس *(Streptomyces aureofaciens)* ومن ثم أوكسيتتراسيكلين (oxytetracycline) من ستربتوميسس ريموسس *(S. rimosus)* (الشكل ٤,٥). ومن صنف الأعضاء الأكثر حداثة يشمل ٦-ديوكسي-٥-هيدروكسيتتراسيكلين (دوكسيسيكلين) (6-deoxy-5-hydroxytetracycline (doxycycline)) التي أدخلت في ١٩٦٧م (شوبرا وروبرتس Chopra and Roberts, 2001). إن انعدام الأشكال الجديدة من التتراسيكلين في السنوات الثلاثين الماضية يعكس انحدار دوره كخط علاجي للعديد من العداوى في الإنسان ولكن التَطوُّر السريري الجاري للتيجيسيكلين (tigicycline)، الجليسيلسيكلين الذي يثبط التدفق (efflux)، يدل على الرغبة المستمرة في صنف أعضاء مضادّات البوليكيتيد هذه. الهيكل الحلقي ١٩- كربون أربعة –حلقات (19-carbon four ring cyclic skeleton) مشتق من الجزيء المبديء و٨ جزيئات من مالونيل -CoA (malonyl CoA) (انظر الفصل الثاني عشر) بواسطة الفعل التكراري للبوليكيتيد سينثاز (polyketide synthase) (رولنج Rawling, 1999). تعدُّ التتراسيكلينات مثبطة للبكتيريا بشكل كبير وتعمل عند الوحدة الفرعية الريبوسومية 50S لتعرقل ربط – مينو أسيل –tRNA الواردة إلى الموقع A. إن الانتقائية ضد الريبوسومات البكتيرية مقابل الريبوسومات في سويات النواة هو بسبب كل من الفروقات التركيبية في رنـا للوحدات الفرعية الريبوسومية والتركيز الانتقائي في الخلايا البكتيرية الحساسة (شوبرا وروبرتس Chopra and Roberts, 2001). إن تحديد التركيب للوحدة الفرعية 30S الريبوسومية من أليفة الحرارة *(T.thermophilus)* (بروديرسين وآخرون Brodersen *et al.*, 2000، بيوليتي وآخرون Pioletti *et al.*, 2001) مع الدواء المرتبط قد أظهر ربط أكبر وموقع ربط ذا مجاذبة – أقل للتراسيكلين (اللوحة الملونة A٤,٦).

للموقع الكبير رنا فقط، وليس بروتين، يتفاعل مع التتراسيكلين بالقرب من موقع المستقبل (A) لربط أمينو– أسيل –tRNA في تجويف بعرض 20 Å وعمق 7 Å. وكما يظهر في اللوحة الملونة (B ٤,٦)، فإن الأكسجين في روابط إنترنيوكليوتيد فوسفوداي إيستر (internucleotide phosphodiester links) في 16S rRNA لفة ٣٤ يكوِّن تفاعلات كهرباء ساكنة (electrostatic interactions)، مباشرة أو من خلال أيون الماغنيسيوم Mg إلى حافة قاع التتراسيكلين. ويشير التركيب المرتبط أنه بينما التتراسيكلين سوف لن يعرقل الارتباط الأولي للأمينو أسيل –tRNA والتحلل المائي لـGTP بواسطة العامل المبديء EF- Tu الذي يحضر ولادة tRNA، فالدوران المتعاقب بعد ذلك يطلق قبل الآوان لينهي الدورة بدون تكوين رابطة ببتيد.



الشكل (٤,٥). تراكيب التتراسيكلين، كلورتتراسيكلين، أوكسيتتراسيكلين، دوكسيسيكلين، جليسيلسيكلين (DMG-MINO)، وتيجيسيكلين.



اللوحة الملونة (٤,٦). (A) موقع الربط للتتراسيكلين مع 16S rRNA على الوحدة الفرعية البكتيرية 30S للريبوسوم، (B) تفاعلات التتراسيكلين مع لفة ٣٤ لـ 16S RNA. (مقتبسة بالإذن من بروديرسن وآخرون Brodersen *et al.*, 2000).

ويسبب التّطوُّر التدريجي للبكتيريا المقاومة خلال عشرات السنين من الاستعمال للتراسيكلينات ومشتقاتها (شرحت الآلية في الفصل التاسع)، فقد انخفضت استعمالاته في خط المعالجة الأول. ولكن برامج مهاجمة آليات المقاومة جارية. وعلى سبيل المثال، استبدال التتراسيكلين عند وضع -٩ مع جليسين أميد (glycine amide) أنتج وظيفياً مركب DMG-DMDOT (اللوحة الملونة B٤،٦) ذا نشاط ضد الإشريكية القولونية المقاومة للتراسيكلين والمكورة العنقودية الذهبية، وكذلك ضد المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمشسيلين (MRSA) (انظر شوبرا وروبرتس Chopra and Roberts, 2001، وللمراجعة تشو وآخرون، ١٩٩٦).

إضافة إلى آليات تدفق التراسيكلين والتي سوف تشرح في الفصل التاسع، سيمثل صنف ثاني من المقاومة بواسطة بروتينات TetO and TetM، التي قد عبر عنها كبروتينات حماية ريبوسومية. ويعرف الآن أن TetO and TetM هما تراكيب مشابهة لعنصر الإطالة EF-G، وهو إنزيم GTPase مسئول عن نقل مكان أمينو أسيل -ويبْتيديل tRNA من المواقع A and P إلى المواقع P and E في دورات نقل المواقع. وأظهر تحليل المجهر الإلكتروني (سباهن وآخرون Spahn *et al.*, 2001) لربط TetO تعارض مع موقع الربط EF-G ولكن فشل في تحريض التغييرات البنيوية للريبوسوم والتي تؤدي إلى انتقال الموضع. وبدلاً عن ذلك فإن التحلل المائي لـ GTP بواسطة TetO يفترض أن يشوش اللفة ٣٤ في 16S rRNA، مؤدياً إلى بنية ذاتاً لفة- أقل للتراسيكلين وإطلاقه. وهكذا ففائدة عمل GTPase هي لرفع التراسيكلين بعيداً عن الريبوسوم وتخفيف تثبيط البناء الحيوي للبروتين.

مضادّات الأمينوغليكوسيد (Aminoglycoside antibiotics)

لقد استعملت الأمينوغليكوسيدات بشكل واسع لعشرات السنين، بعد اكتشاف ستربتوميسين في ١٩٤٤م (للمراجعة، انظر بيبرسبيرج Piepersberg, 1997)، في عديد من الحالات السريرية كمضاد بكتيري للعداوى بسبب عمله القاتل للبكتيريا والتآزر الملحوظ مع المضادّات الحيوية الأخرى. ولقد اقترح أن المصطلح البديل أمينوسيكليتولات (aminocyclitols) يجب أن يستخدم ليشمل الاختلاف الواسع في التراكيب في صنف المضاد الحيوي هذا (بيبرسبيرج، ١٩٩٧). هي سكريات أليفة الماء ذات مجموعات أمينو متعدِّدة، بروتونية (protonated) عند التركيز الهيدروجيني الأيوني (PH) الفسيولوجي لتعمل كمتعدِّدة الكتيونات (polycations) وتستهدف مناطق الوصول في 16S rRNA متعدد الأيون (polyanionic) على الريبوسوم 30S، وبالتحديد الموقع A الخاص بربط أمينو أسيل- tRNA (كارتروآخرون Carter *et al.*, 2000). لقد تم اختيار عديداً من أجيال أمينوغليكوسيدات سريرياً، مع الأعضاء البارزين من عائلة توبراميسين (tobramycin)، جنتاميسين (gentamicin)، واميكاسين (amikacin) (الشكل ٤،٦) التي تحت الاستعمال السريري المعاصر. تم تناول التكوين الحيوي لصنفين أساسيين من الأمينوغليكوسيدات في الفصل

الرابع عشر. تظهر الأمينوغليكوسيدات انسمام كلوي (renal toxicity) وانسمام أذني (ototoxicity) واللذين يعتبران حصراً محدوداً. ويعتقد أن يكون الانسمام الأذني من خلال خلابات حديد (iron chelates) الأمينوغليكوسيدات التي تختزل O_2 إلى جذور الأكسجين (oxygen radicals) التي تتلف خلايا الشعر في الأذن. إن الأمينوغليكوسيدات أدوية قوية ضد البكتيريا السالبة لغرام ولكنها ليست فعالة ضد الكائنات الموجبة لغرام (تشولار وبرات Scholar and Pratt, 2000)، على الرغم من أن توليفة (تجميعة) الأمينوغليكوسيدات وبيتالكتامات تستعمل لمعالجة العداوى المكوراتية المعوية. ولوحظ أن التآزرمع مضادّات البيتالاكتام الحيوية، وتوليفات الجنتاميسين، توبراميسين، أو أميكاسين مع تايكارسلين (ticarcillin) أو بيبراسيلين (piperacillin) تعد فعالة ضد العداوى التي تسببها الزائفة الزنجارية. ويوجد عديدٌ من طرق إزالة تثبيط الفعاليّة الإنزيمية في البكتيريا المقاومة كما سيلاحظ في الفصل الثامن.

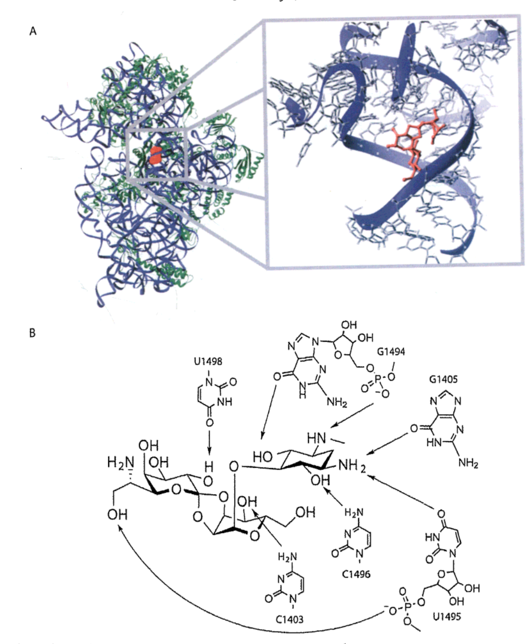
لقد تم حل تركيب الأمينوسيكليتول، هيجروميسين ب (hygromycin B) المرتبط بالوحدة الفرعية لريبوسوم 30S لأليفة الحرارة *T.thermophilus* بواسطة تحليل أشعة إكس (بروديرسن وآخرون Brodersen *et al*., 2000) (اللوحة الملونة ٤،٧ A) وتم مشاهدة موقع الربط الفردي عند قمة اللفة ٤٤، بجانب المواقع A,P,E التابعة لـtRNA. والتماس يكون مع قواعد رنا وليس مع ذرات الهيكل الأساسية، مؤدياً إلى نوعية تعاقب عالية في إصطفاف ممتد. وباعتبار حقيقة أن هيجروميسين B قد وُجِد أنه يحجز tRNA عند الموقع A للريبوسوم، فمن المحتمل أن ارتباط الدواء يعرقل نقل البنية المطلوب أثناء عملية تكوين نقل موضع رابطة الببْتيد. ربط الستربتوميسين عند الوحدة الفرعية 16S تم وصفه بالمثل بواسطة تحليل الأشعة السينية (اللوحة الملونة ٤،٧ B) (بروديرسن وآخرون Brodersen *et al*., 2000)، مما يعطي رؤى قوية حول كيفية إحضار الأمينوسيكليتولات خطوات نقل الموضع للبناء الحيوي للبروتين في الريبوسوم نحو التوقف.

Tobramycin

Amikacin

Hygromycin B

الشكل (٤،٦). مضادّات الأمينوغليكوسيدات الحيوية: توبراميسين، أميكاسين، وهيجروميسين ب.

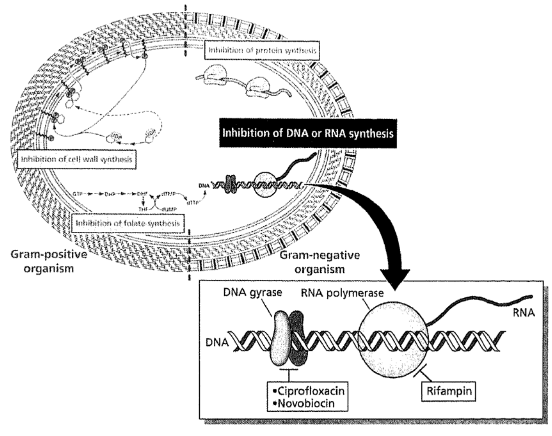


اللوحة الملونة (٤,٧). موقع الربط لـــ (A) الامينوغليكوسيد هيجروميسين ب و(B) ستربتوميسين مع 16S Rrna للوحدة الفرعي الريبوسومية 30S. (مقتبسة من بروديرسن وآخرون Brodersen *et al.*, 2000).

لينيزوليد (Linezolid): مضاد أوكسازولدينون الحيوي المصنَع

المضاد الحيوي الوحيد المصنَع بالكامل وفي الاستعمال السريري الذي يعرقل تبناءالبروتين عند الريبوسوم هو لينيزوليد (الشكل ٤,٣)، وقد تمت المصادقة عليه بواسطة إدارة الغذاء والدواء الأمريكية في عام ٢٠٠٠م. إن لب ناقل العقار (core pharmacophore) للينوزوليد هو حلقة أوكسازوليدينون (oxazolidinone ring)، وقد تم وصفه

كاول مضاد حيوي تركيبي جديد تم تقديمه في ثلاثة عقود (تالي وديبرون Tally and DeBruin, 2000). ولقد تم العثور على طفرات المقاومة للينيزوليد (كلوس وآخرون Kloss *et al.*, 1999) المرسومة على مواقع 23S rRNA بجانب مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل)، وهي متوافقة مع الدراسات الحديثة المتعلقة بالحركية التي أظهرت أن أوكسازوليدينون هي مثبطات تنافسية لكل من مواد الموقع A والموقع P (باتيل وآخرون Patel *et al.*, 2001). ولقد تم افتراض آلية العمل بأنها إحتلال الموقع P في مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) في الريبوسوم، الذي يعرقل الخطوة الأولى لتكوين رابطة الببْتيد في تكوين البروتين (باتيل وآخرون Patel *et al.*, 2001). إن اللينيزوليد هو أكثر فعاليّة ضد البكتيريا الموجبة– لغرام وتشمل VRE وله إتاحة حيوية – فموية عالية. وسيتم توضيح النقبة العلاجية مع مرور زمن المصادقة عليه وبتراكم الخبرة السريرية.



المضادّات الحيوية التي تعرقل تكرار دنا ورنا



المضادّات الحيوية التي تعرقل تكرار وترميم الحمض النووي دنا: الكوينولونات

ANTIBIOTICS THAT BLOCK DNA REPLICATION AND REPAIR: THE QUINOLONES

المجموعة الوظيفية الثالثة الكبرى للمضادّات الحيوية هي تلك التي تعرقل تكرار (replication) وترميم (repair) الحمض النووي دنا DNA. يسلط الشكل على الصفحة المقابلة الضوء على القسم الفرعي الموافق للشكل (٢,٢) وعلى تثبيط تكوين دنا DNA و رنا RNA بواسطة الأدوية المضادة البكتيرية من صنف الكوينولون (quuinolone) وريفاميسين (rifamycin). كما أن صنف الريفاميسين من مضادّات عديد الببْتيد / وعديد الكيتيد (polyketide) الحيوية تم تناولها في الفصل القادم.

إنزيم دنا غيراز (DNA gyrase) كهدف للكوينولونات (quinolones) والكومارينات (coumarins)

إن تثبيط تكرار دنا (DNA) وإنزيمات الترميم يبدوهدف منطقي لعمل المضاد البكتيري بواسطة منتجات طبيعية تصنع بواسطة مكروبات لتقتل جيرانها. وأحد هذه أصناف هذه الجزيئات، هو الكومارينات، مُمَثَّلة بواسطة مستقلبات (أيضات) المتسلسلة (streptomycete) مثل نوفوبيوسين (novobiocin) و كوميرميسين (coumermycin) (الشكل ٥,١A)، والتي قد تمت دراستها لعدة سنوات وخدمت لتحدد الإنزيمات المسماة دنا النوع II توبوايزوميرازات أو إنزيمات توبوايزوميرازات (موضع التزامر) (DNA type II topoisomerases) وبالأخص دنا غيراز (الجدول ٥,١) كهدف قاتل (ماكسويل Maxwell, 1997). ولكن الصنف من الجزيئات المصنَعة، وهي فلوروكوينولونات (fluoroquinolones) مُمَثَّلةً بليفوفلوكساسين وسبروفلوكساسين (levofloxacin and ciprofloxacin) (الشكل ٥,١ B)، والتي قد أصبحت تستعمل بشكل واسع ؛ بسبب فعاليتها ضد كل من البكتيريا السالبة والموجبة – لغرام في عداوى الجهاز البولي، التهاب العظام، الالتهاب الرئوي المكتسب من المجتمع والتهاب المعدة والأمعاء (جرينوود Greenwood, 2000، شولار وبرات Scholar and Pratt, 2000). وعلى العموم فإن الجيل الأحدث من

الكوينولونات، مثال جاتيفلوكساسين (gatifloxacin) (الشكل ٥،١ C)، لها فعاليّة متزايدة ضد الممرضات الموجبة – لغرام (برونسون وباريت Bronson and Barrett, 2001a). ولقد اكتسب السبروفلوكساسين شهرة حديثة أكثر كدواء مصادق عليه من قبل هيئة الغذاء والدواء لقتل العصية الجمرية *(Bacillus anthracis)* في عداوى الجمرة.

الشكل (٥،١). المضادّات الحيوية التي تثبط دنا غيراز وتوبوأيزوميراز IV: (A) مضادّات أمينوكيومارين الحيوية (aminocoumarin antibiotics)، (B) الكوينولونات (سبروفلوكساسين وليفوفلوكساسين)، و(C) الكوينولونات الجديدة (جاتيفلوكساسين).

تغير إنزيمات دنا توبوأيزوميراز العدد الارتباطي في دنا زائد اللفة (supercoiled) بواسطة عمل قطع مؤقت في ركيزة دنا ومن ثم تمرير ليرتاح وضعياً (بوضع جنيني) من خلال كسر مؤقت، إما خيط واحد في المرة (النوع I) وإما كلا الخيطين في الوقت نفسه (النوع II) (الجدول ٥،١). (للمراجعة انظر ماكسويل Maxwell, 1997، ووانج Wang, 1996). وتعتبر إنزيمات توبوأيزوميرازات أساسية لحيوية الخلية في كل من خلايا بدائيات النواة وخلايا سويات النواة، وتعتبر مثبطات الكوينولون من نوع II أيزوميرازات في الخلايا البكتيرية، مضادّات بكتيرية قوية ذات انتقائية كافية لتكون

نافعة، بينما مثبطات أيزوميرازات في الإنسان تشمل كامبتوثيسين (camptothecin) وإيتوبوسيد (etoposide)، اللذين يستعملان في المعالجة الكيميائية للسرطان لتقتلً خلايا الورم سريعة النمو.

يعتقد أن يكون الإنزيم اللفائفي دنا غيراز مهماً للتحكم في وضعية دنا (topology) في تكرار دنا، التأشيب (recombination)، والانتساخ (transcription)، بينما توبوأيزوميراز (توبو) IV (topo) هو كذلك مشتمل في تكرار دنا ونزع التسلسل (decatenation) من إبنة الكروموسومات المرتبطة عند نهاية تكرار دنا البكتيري (بان وفيشر Pan and Fisher, 1997).

الجدول (٥,١). خواص توبوأيزوميرازات للإشريكية القولونية.

الإنزيم	النوع	جين (جينات)	الوظيفة الأساسية للإنزيم
توبوأيزوميراز I	I	توب أ *(top A)*	يريح اللفات الزائدة السالبة
توبوأيزوميراز II (دنا غيراز)	II	غير أ *(gyrA)* غير ب *(gyr B)*	يدخل لفات زائدة سالبة، ويريح اللفات الزائدة الموجبة
توبوأيزوميرازIII	I	توب ب *(top B)*	ينزع تسلسل وسائط التكرار ومركبات دنا مزدوجة الصيغة الجزيئية (dimmers) بين الروابط
توبوأيزوميراز IV	II	بار س *(parC)* بار إي *(parE)*	ينزع تسلسل دنا، يزيل اللفات الزائدة الموجبة والسالبة

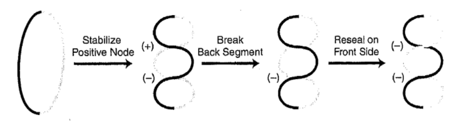
وقد وُجِد أن لبعض الكوينولونات انتقائية لتوبو II (دنا غايراز) أكثر من توبوIV في حين أن الكوينولونات الأخرى تظهر عكس السلوك. ومن ناحية أخرى تم اقتراح أن يكون توبو IV الهدف الأولي في سلالات المكورة الذهبية العنقودية، بينما في سلالات المكورة العقدية الرئوية، يختلف الهدف الأولي بين توبو II وتوبو IV (نج وآخرون Ng *et al.*, 1996). وقد قيم تاكي وآخرون (Takei *et al.*, 2001) حديثاً ١٥ من الكوينولونات ضد المكورة العنقودية الذهبية MS5935 وقسّم الدواء إلى ثلاثة أصناف. أحد المجموعات (نورفلوكساسين (norfloxacin)، سبروفلوكساسين (ciprofloxacin)، ليفوفلوكساسين (levofloxacin) وغيرها) يبدو أنها تهدف توبوIV تفضيلياً بينما صنف آخر (سبارفلوكساسين (sparfloxacin)، ناديفلوكساسين (nadifloxacin) كان أكثر انتقائية لـ دنا غيراز (توبو II). والمجموعة الثالثة من الكوينولونات (جاتيفلوكساسين (gatifloxacin)، موكسيفلوكساسين (moxifloxacin)، وغيرهم) تهدف توبوII وتوبو IV بالتساوي في السلالات الأبوية والطفرات للمكورة العنقودية الذهبية.

الدورة الحفازة للإنزيم اللفائفي دنا غايراز

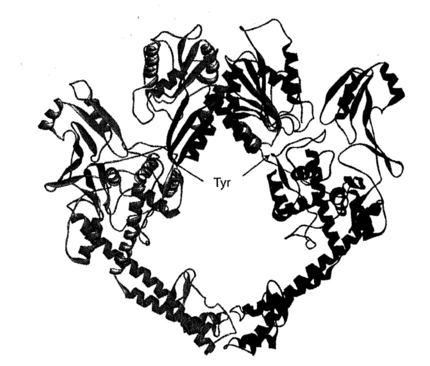
إن إنزيم دنا غيراز الذي يوجد في جميع الخلايا البكتيرية هو إنزيم A_2B_2 رباعي الأقسام متغاير (heterotetrameric)، ومشفَر (مُرمَّز) بواسطة الوحدات الفرعية جيرأ وجير ب *gyrA* and *gyrB*، وتوبوIV أيزوميراز

(topo IV isomerase) المشابه المرمزبواسطة جينات بار س وبار إي *(par C and par E)* تتبع نفس الآلية. يُدخل دنا غيراز لفات زائدة سالبة في ركيزة دنا الحلقي ذا الخيط- المزدوج. لاحظ كوزاريللي (Cozzarelli, 1980) المتطلبات الأزمة لهذا الغرس الموضعي أولا كالتواء لـ دنا لإنتاج قالب ذي عقدة موجبة (الشكل ٥,٢)، وانغلاق الخيط- المزدوج للقطعة الخلفية، مرور الخيط-المزدوج خلال الكسر، ثم إعادة التحام للخيط- المزدوج على الجانب الأمامي.

ويعتبر النوع II من الدورة المحفزة ملاحظ آلياً، وأن التركيب الهندسي للتوبوأيزوميرازات معقد بشكل لائق، كما يظهر بواسطة تركيب أشعة -إكس لجزء كبير من خميرة توبو II (بيرجر وآخرون Berger *et al.*, 1996) (الشكل ٥,٣).



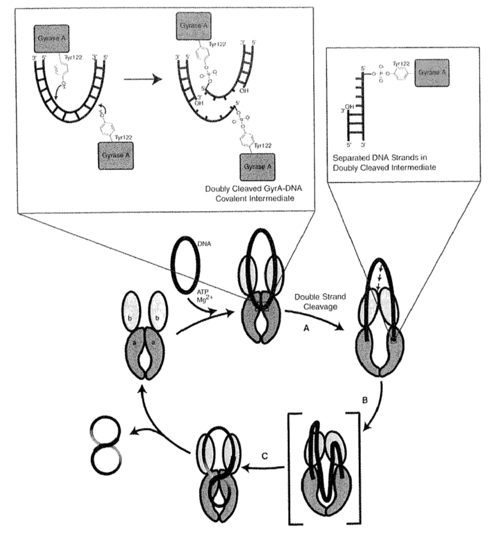
الشكل (٥,٢). نموذج لتكوين اللفة الزائدة بواسطة دنا غيراز البكتيري. (بواسطة كوزاريللي ١٩٨٠).



الشكل (٥,٣). تركيب أشعة إكس للمركب مزدوج الصيغة الجزيئية (المثنوي) الجزء -92 kDa لخميرة توبوأيزوميراز II (من بيرجر وآخرون (Berger *et al.*, 1996).

وبعد ربط دنا مزدوج- الخيط في معقد الإنزيم -الركيزة الأولي ((enzyme –substrate (ES)، يهاجم فينوليك هيدروكسيل أليف النواة (nucleophilic phenolic hydroxyl) لتير ٢٢ (Tyr_{22}) (ترقيم الإشريكية القولونية) على واحد من اثنين من الوحدات الفرعية GyrA ويهاجم الرابط داخل رابطة إنترنيوكليوتيد ثنائي إستر الفوسفات (internucleotide phosphodiester bond) على أحد خيوط دنا، ليفلق ذلك الخيط لينتج نهاية النهاية OH- '3 الحرة، ويمسك نهاية '٥ كوسيط دنا -فوسفوتيروسيل وسيط تساهمي (DNA-phosphotyrosyl covalent intermediate) (الشكل ٥,٤ A). وفي هذه الأثناء، يهاجم Tyr المكافئ في الوحدة الفرعية الثانية GyrA، رابطة انترنيوكليوتيد ثنائي إستر الفوسفات على أربعة نيوكليوتيدات من الخيط الآخر لل دنا في أسفل التيار ليكمل كسر الخيط -المزدوج ويصنع الإنزيم الوسيط الثاني DNA-5'-P-tyrosyl على الخيط المكمل. وذلك يكمل خطوة انفلاق دنا وينتج نهايتان دنا '3 حرة، ما تزالا تقترن قاعدياً في مكان آخر في اللفة المزدوجة، ونهايتان 5'-GyrA DNA متشكلة تساهمياً. ولفجوة الخيط -المزدوج ٤ قواعد بارزة، ولكن من المحتمل وجود عد لف موضعي وتوسيع للفجوة، ربما يتم بواسطة التغيير البنيوي في الإنزيم – كسر دنا الوسيط التساهمي لتعريض الفجوة بحيث إن الإنزيم يستطيع الآن أن يوافق مرور اللفة المزدوجة ذات العرض 20-Å (الشكل ٥,٤ B) خلال الفجوة ليؤثر على الاسترخاء الموضعي (topological relaxation).

توجد منطقة بوابة لل دنا في خميرة إنزيم توبو II التي أيدت النموذج المشار إليه في مرور الخيط- المزدوج .ومن الواضح أنه يجب أن يكون هناك تغييرات كبيرة في بنية كل من الإنزيمين وتمرير دنا عند عدة مراحل في الدورة المحفزة. وعند هذه النقطة يجب على الإنزيم أن يرمم ذاتياً كسور الخيط -المزدوج، ويعيد تربيط كسر دنا. وبالإمكان إنجاز ذلك بنشاط متشابه بواسطة جعل كل من النهايات 3'-OH لخيوط دنا تهاجم إنزيم $5'$-P-Tyr_{122} على كل وحدة GyrA فرعية، وتوليد فوسفورين المخموس المساهم المقرِب (pentacovalent phosphorane adduct) ومن ثم إخراج تير١٢٢-فينوليت (Tyr_{122}- phenolate) تاركاً المجموعة لإعادة تربيط كل خيط. وهذا هو معقد ناتج-الإنزيم (E.P)، والخيط-المزدوج- دنا السليم، المسترخي يستطيع التفكك أو الدخول في دورة محفزة أخرى من إنقاص رقم الربط الوضعي: كسور الخيط-المزدوج، مرور دنا خلال الفجوة وسيط الركيزة- الإنزيم التساهمي، يتبعها تربيط الخيط -المزدوج. يتميز دنا غيراز عن توبو IV والأنواع الأخرى من II توبوأيزوميرازات بأن له القدرة على دفع التكافؤ في الاتجاه الآخر، ليس للاسترخاء ولكن للالتفاف الشديد، بواسطة استعمال انفلاق دنا إلى ADP و P_i كقوة حرارية حركية دافعة (ماكسويل، ١٩٩٧).



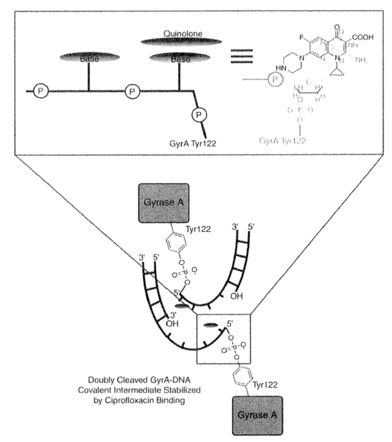
الشكل (٤,٥). رسم لآلية دنا غيراز: (A) إنفلاق الخيط – المزدوج دنا وتكوين الإنزيم المزدوج التساهمي، (B) مرور الخيط – المزدوج لعدد ربط أقل، و(C) إعادة تربيط للــ دنا المزدوج الكسر.

آلية عمل مضادّات الكوينولون المضادة البكتيرية

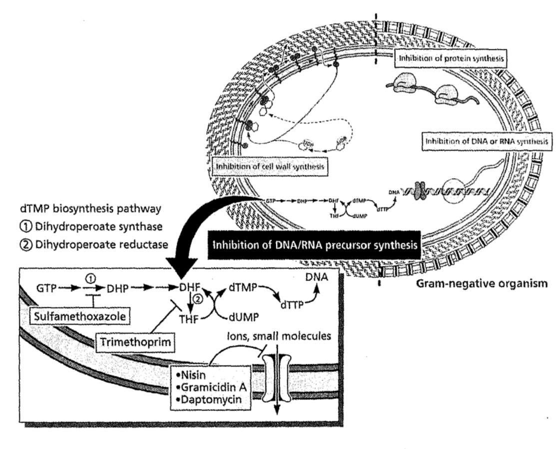
لقد تم صنع الآلآف من مضادّات الفلوروكونولونات حول لب النواة المستوى الحلقي المتغاير (planar heterocyclic nucleus) الذي يكسب العائلة اسمها (ولفسون وهوبر Wolfson and Hooper, 1989). وقد بينت التحاليل المكثفة أن الكوينولونات يؤثر على توازن انفلاق/وتربيط الخيط –المزدوج في الدورات الحفّازة للغيراز وتوبو IV، حيث يتراكم المعقد المنفلق .يُمنع الوسيط المكافئ $DNA\text{-}5'\text{-}P\text{-}Tyr_{122}$ الموجود على كل وحدة فرعية GyrA من إعادة التربيط القابل للعكس في وجود الكوينولونات. كما توجد توقعات حول هل يُسرِّع الكوينولونات خطوة الانفلاق –المزدوج لل دنا المرتبط أو أنه يبطء انتقائياً خطوة إعادة التربيط– المزدوج، بدون دليل واضح ومحدد لأي من التفسيرات. إن الآلية عن

كيفية تحفيز الكوينولونات لتراكم وسيط الإنزيم دنا التساهمي– مزدوج الكسر ما تزال غامضة. وتوجد نقاط ساخنة على كل من الوحدات الفرعية لـGyrA, GyrB التي المقاومة للكوينولونات، مما يفترض تفاعل إنزيم كلا الوحدات الفرعية مع الدواء المرتبط، ومن المحتمل أن الكوينولونات تتفاعل كذلك مع دنا المنفلق. كما أن التوقعات متقدمة حول كل من تكدس –القاعدة للحلقة المتغايرة للكوينولون المستوي والتعقيد المتواسط بالمغنيسيوم (Mg^{2+}) مع واحد أو أكثر من مجموعات فوسفات دنا، إضافة إلى فكرة أن حلقة الكوينولون تُقحم عند نهاية 3′ end في كسر دنا في المكان الذي تم إخلاؤه بواسطة الجزء 5′ المستبدل لكسر دنا (الشكل ٥,٥). وقد يكون تحليل أشعة –إكس للكوينولون– الإنزيم– وسيط– دنا المنفلق الطريقة الوحيدة لحل هذا الغموض وتغيير تصميم دواء الكوينولون لمستوى جديد.

وبمجرد تراكم كوينولون– غيراز التساهمي–وسيط كسر دنا – المزدوج، يعتقد بأن فعل القتل يكون من التأثير أسفل التيار لهذه العرقلة على تقدم تكرار تفرعات دنا التي أوقفت بذلك (ماكسويل، ١٩٩٧). وربما أن آلية ترميم دنا قد جُهزت، والمحاولات للوصول للإنقاذ– تفشل باستمرار كوينولون المعاند – غيراز المثبّت – وسيط دنا. وقد يكون ذلك الإشارة المحفزة بالكوينولونات التي تأذن بالعملية التي تؤدي إلى القتل السريع للبكتيريا.



الشكل (٥,٥). الآلية المحتملة لتكوين قاعدة الكوينولون لتثبيت وسيط الإنزيم المكافئ مع كسور دنا المزدوج – الخيط.



أهداف أخرى مصادقة للأدوية المضادة البكتيرية

الفصل السادس

أهداف أخرى للأدوية المضادة للبكتيريا

OTHER TARGETS OF ANTIBACTERIAL DRUGS

الشكل في مقدمة الفصل يعتبر الرابع من هذه الرسومات، وهي موجودة في كل من الفصول الثالث إلى السادس، والتي تسلط الضوء على المجموعات الأساسية للمضادّات الحيوية. ويشمل ذلك الأدوية التي تعرقل البناء الحيوي لطليعة (precursor) الأحماض النووية إضافة إلى المضادّات الحيوية التي تعمل على تعطيل جانب واحد أو أكثر من وظائف الغشاء البكتيري.

أيض حامض الفوليك: الهدف لسلفاميوكسازول – ترايميثوبريم

(sulfamethoxazole-trimethoprim)

تعدُّ أدوية السلفا من صنف الكيميائيات المصنَّعة والمستعملة لفترات زمنية طويلة كمضادّات بكتيرية فعالة، واختبرت بداية في الثلاثينيات كجزيئات قاتلة -للبكتيريا. والجيل الحالي من أدوية السلفا هو سلفاميثوكسازول، والذي يستعمل كتوليفة مع ترايميثوبريم (الشكل ٦,١ A) لمعالجة المرضى المصابين بعداوى الجهاز البولي وكذلك لمرضى الإيدز المصابين بعداوى المتكيسة الرئوية الجؤوجؤية (*Pneumocystis carinii*) (تشولار وبرات Scholar and Pratt, 2000). وهذا الدواء الزوج يصادق كذلك على أن توليفة المعالجة الكيميائية بالإمكان أن تكون إستراتيجية فعالة في معالجة العداوى البكتيرية. وكل من جزيئات الدواء تعرقل خطوة في أيض حامض الفوليك. فالسلفاميثوكسازول يعرقل إنزيم دايهيدروبيتيروات سينثاز (dihydropteroate synthase) في مسار البناء الحيوي للفوليت وبينما يثبط ترايميثوبريم ثنائي هيدروفوليت ريدكتاز (dihydrofolate reductase) (DHFR)، الذي يعتبر الإنزيم الأساسي الذي يوفر الاحتياج من بيريديم ثيميديليت (pyridime thymidylate) للبناء الحيوي للد دنا (الشكل ٦,١ B). وهكذا فالمنطق وراء التوليفة هو العرقلة التآزرية (synergistic blockade) لخطوتين مختلفتين في الكيمياء الحيوية لهذا الإنزيم الأساسي المشارك (coenzyme). ويتوجب على البكتيريا أن تصنع هيكل فوليت من جديد، بينما تستطيع سويات النواة أن تبحث عن الفوليت من المصادر الغذائية وتنقلها داخل الخلايا. إن هدف ثنائي هيدروبتيروات سينثاز (dihydropteroate synthase) (غائب بالكامل في الإنسان بينما DHFR يملك فروقات تركيبية كافية من خلالها يمكن تحقيق التثبيط الانتقائي.

A

Sulfamethoxazole Trimethoprim

B

7,8-Dihydropterin Pyrophosphate *para*-Aminobenzoate

Sulfamethoxazole — Dihydropteroate Synthase

7,8-Dihydropteroate + PPi

7,8-Dihydrofolate

NADPH +H+ / NADP+

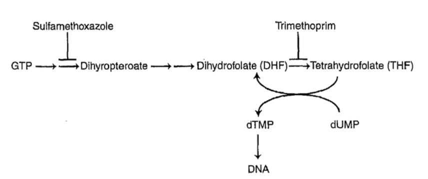
Trimethoprim — Dihydrofolate Reductase

5,6,7,8-Tetrahydrofolate

الشكل (٦,١). (A) توليفة سلفاميثوكسازول–ترايميثوبريم، (B) التفاعلات الحفّازة بواسطة الإنزيمات المستهدفة، ثنائي هيدروتيروات سينثتاز وثنائي هيدروفولات ردكتاز (dihydropteroate synthase وdihydrofolate reductase).

يُحشد dihydropteroate إنزيمياً من طليعة ٧,٨–دايهيدروبيترين بيروفوسفات (7,8-dihydropterin pyrophosphate precursor)، والذي ينبثق بحد ذاته من نيوكليوتيد GTP الشائع والمادة المشاركة ب– أمينوبنزوات (p-aminobenzoate (PABA)). إن التحول الكيميائي غير عادي، وبناء رابطة أمين CH_2-NH amine bond بواسطة استبدال الأكسجين الكحولي (alcoholate oxygen). وفي هذه الحالة يتم تحويل الأكسجين إلى مجموعة مغادرة منخفضة– الطاقة بواسطة الاشتقاق (derivatization) المسبق كشطر بيروفوسفات. ولاحقا يتم غلوتميليت (glutamylated) الناتج دايهيدروبيترويت إنزيمياً لإكمال

البناء الإنزيمي لهيكل الفوليت (الشكل ٦،٢). عندما لوحظ ان السلفوناميدات التي تحتوي على أمينات الأريل (aryl amines) هي مضادّات بكتيرية، تتبعت الآلية أخيراً على أنها تقليد لـ PABA في هذا التفاعل الإنزيمي. فالسلفوناميد على سبيل المثال (الشكل ٦،٣) هي تقليد بسيط جداً، بينما للسلفاميثوكسازول حلقة غير متجانسة على نيتروجين السلفوناميد. وهذه مثبطات تنافسية للـ PABA الموقع النشط لـ ديهيدروبتيروات سينثاز dihydropteroate synthase وتستطيع أن تعمل كمادة بديلة أيضاً. وعند حدوث ذلك التدفق يتم جر البترين (pterin) إلى نهاية أيض ميتة حيث إن هذه المقربات نحو المركز (adducts) لا تعد مواد بترويلغلوتاميلترانسفيرازات (pteroylglutamyltransferases). لقد تم تحديد تركيب أشعة-إكس لإنزيم الإشريكية القولونية المعقد مع dihydropterin pyrophosphate وسلفانيلميد (sulfanilamide) (أكاري وآخرون Achari *et al.*, 1997)، مما أثبت آلية التثبيط.



الشكل (٦،٢). سبيل البناء الحيوي البكتيري من GTP إلى بيترويل – بوليغلوتامات (فوليت) (petroyl-polyglutamate) (folate).

الشكل (٦،٣). أدوية السلفا كمثبطات تنافسية ومواد بديلة لثنائي هيدروتيروات سينثاز (dihydropteroate synthase).

يعرقل الترايميثوبريم إعادة التدوير الإنزيمية للإنزيمات المشاركة للفوليت من (7,8-dihydrofolate DHF) إلى (5,6,7,8-tetrahydrofolate THF) حالة الأكسدة بواسطة DHFR. وDHFR هو جزء من ثلاثة إنزيمات من دورة الأيض (الشكل ٦،٤)، التي تحول مجموعة CH_2OH للحامض الأميني سيرين (serine) نحو مجموعة الميثيل C_5-CH_3 لـ2´-dUMP (dTMP=) (thymidylate) بواسطة العمل التعاقبي لسيرين ترانسهيدروكسيميثيلاز (serine

(transhydroxymethylase)، ثيميديليت سينثاز (thymidylate synthase) و DHFR (والش Walsh, 1979). وحيث أن dTMP هو مصدر واحد من أربعة من النيوكليوتيدات، فيتطلب dTTP لتكرار الـ دنا، فيتوقف نمو الخلية عندما ينقطع وجوده. يعتبر تفاعل ثيميديليت سينثاز (thymidylate synthase) مركز هذه الدورة، مستعملاً $5,10\text{-}CH_2\text{-}THF$ كمادة مشاركة مع dUMP ليضيف إختزالياً (reductively install) CH_2 كمجموعة C_5-methyle (CH_3)، على حساب أكسدة هيكل THF إلى DHF. ولا يمكن إعادة الدورة ثانية إلى أن يتم إختزال DHF إلى THF؛ بسبب أنه فقط في حالة أكسدة الهيدروجين الرباعي (tetrahydro oxidation state) يستطيع نيتروجين N_5 أن يهاجم ويمسك $CH_2{=}O$ المنطلق من السيرين.

الشكل (٦،٤). ثلاثة – إنزيمات لدورة الفوليت والمشتملة في تحويل dUMP إلى dTMP للبناء الحيوي للـ دنا.

يعدُّ DHFR أساسي لجميع الخلايا. وتثبيطه انتقائياً بواسطة ترايميثوبريم في البكتيريا ينتج دواء مضاد بكتيري، وعمل سيكلوغوانيل (cycloguanil's action) في طفيليات الملاريا يعطي عامل مضاد للملاريا، وعمل ميثوتركسيت (methotrexate's action) في خلايا الإنسان يؤدي إلى استعماله الواسع في نظام المعالجة الكيميائية للسرطان. ويبلغ K_i لـ DHFRs البكتيري الآزم لتثبيط اختزال DHF بواسطة ترايميثوبريم حوالي ٥ إلى ١٥ nM، قوي جداً بالفعل بينما يبلغ ٥٠٪ التركيز الأدنى المثبط لـDHFR في الإنسان حوالي ٣٠٠,٠٠٠ nM (تشولار وبرات Scholar, and Pratt, 2000)، انتقائية لـDHFRs البكتيري أعلى من ذلك الفقاريات بحوالي ٦٠,٠٠٠- طية. وتوجد تراكيب أشعة -إكس لكلا النوعين من إنزيمات DHFR لتساعد الجهود المستمرة لزيادة الانتقائية لأعلى مستوى.

إن تقييم جدارة مثبط ثنائي هيدروبتيروات سينثاز (dihydropteroate synthase) ومثبط DHFR المستعملة كتوليفة يقترح أنه بينما السلفوناميدات تغلق البناء الجديد للفوليت، فمستويات الفوليت المتجمعة ستأخذ عدة أجيال لتتناقص، عاملةً على آلية قتل بطيئة. إن إضافة ترايميثوبريم يحبس جزيئات إنزيم الفوليت المشارك في الشكل DHF غير المفيد بعد كل دورة من بناء dUMP، مؤدياً إلى النقص السريع لشكل THF من الإنزيم المشارك. وفيما يخص البكتيريا الحساسة في عداوى الجهاز البولي، يستطيع الترايميثوبريم إظهار ١٠٠- طية تآزر مع دواء السلفا (تشولار وبرات Scholar, and Pratt, 2000، الجدول ٧.٥).

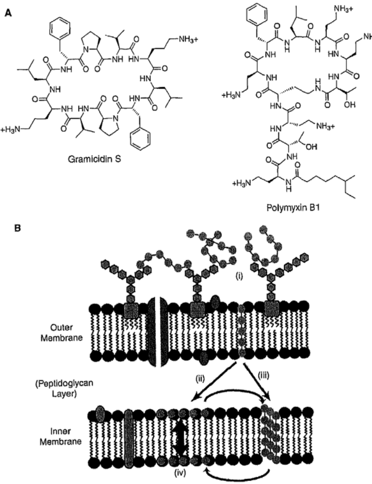
إن إختيار توليفة ثابتة من السلفاميثوكسازول وترايميثوبريم (انظر تشولار وبرات Scholar and Pratt, 2000) يماثل كذلك أعمارهم النصفية في جسم الإنسان من ٩-١٢ ساعة، وبهذه المستويات لكلا الدوائين تكون فعالة خلال فترة الجرعة. ولقد تَطوّرت المقاومة لكل من السلفوناميدات والتريميثوبريم (الفصل السابع عشر) بعد سنوات من الاستعمال السريري، مما يثير الجدل حول الحاجة للإستبدالات التركيبية للأدوية لهذه الإنزيمات المستهدفة.

مضادّات البِبْتيد (Peptide antibiotics)

تصنع البكتيريا، الفطريات، النباتات، سويات النواة العليا وحتى الإنسان مضادّات البِبْتيد المضادة للمكروبات، وتشمل مجينينات (imagainins) من الضفادع وديفنسينات (defensins) من الإنسان (هانكوك وتشابلي Hancock and Chapple, 1999). لقد لاحظنا في الفصول السابقة الببتيدات غير المشتقة من الريبوسومات (nonribosomally derived peptides) والتي تعطي مضادّات البيتالاكتام الحيوية، مضادّات الغليكوببتيد (البِبْتيد السكري) من صنف فانكوميسن، وليبوغليكوبِبْتيدات (الببتيدات السكرية الدهنية) راموبلانين (ramoplanin) وتيكوبلانين (teicoplanin) وتوليفة كوينوبريستين- دالفوبريستين (quinupristin-dalfopristin) سينيرسيد (Synercid). هذه وكما سنلاحظ لاحقاً في الفصل الثالث عشر، تدمج مكونات حامض أميني غير اعتيادية، هي عالية التعديل ضد تكسر إنزيم البروتياز (protease)، وهي غالباً ما تكون محصورة التركيب البنيوي في بناء هندسي محافظ الذي يبطن تمييز بيولوجي (حيوي) ووظيفة معينة. وبشكل مماثل، للبِبْتيد الريبوسومي الإنتاج ميكروسين B17 (microcin B17) ١٤ من ٤٣ روابط البِبْتيد لهيكله معدلة إلى ٨ دورات متغايرة ذات ٥- حلقة عضوية (5-membered ring heterocycles) قبل أن تَظهر نشاطها ضد إنزيم دنا غيراز (DNA gyrase) (الفصلان الرابع عشر والخامس عشر).

بعض الببتيدات غير الريبوسومية البكتيرية، وتشمل باستراسين (bacitracin)، جراميسيدين S (gramicidin S) وبوليميكسين B (polymyxin B) (الشكل ٦.٥)، بينما تكون حلقية (cyclized) لتحصر التركيب البنيوي ولتنتظم مسبقاً (جراميسيدين S هو صفحة (لويحة) -بيتا حلقية)، ربما تعمل بشكل غير نوعي كبِبْتيدات كتيونية غير أليفة الماء-غارسة للغشاء (membrane-inserting cationic hydrophobic peptides). وللباستراسين كذلك خاصية نوعية لتثبيط إعادة دوران C_{55} أنديكابرينول بيروفوسفيت (C_{55} undecaprenol pyrophosphate) في الأغشية البكتيرية بواسطة

التعقيد المعتمد على الكتيون (cation –dependent complexation) مع الدهن بدلاً من الإنزيم. وهذه الخواص –قاصدة الغشاء تُكسب قابليات سامة وجميع هذه الببتيدات الثلاثة تعد سامة جداً بواسطة خاصية تمزيق الغشاء في خلايا الفقاريات، ولا يمكن استعمالها مجموعياً. كما أن لها مكانة محددة جيداً في صياغات المضادّات الحيوية الموضعية (غير مسمى Anonymous, 1999 ، غير مسمى Anonymous, 2001). الببتيدات الحلقية ذات ستة إلى ثمانية بقايا (residues) مع مراكز -D و -L والتي تم الإبلاغ أنها تتكدس داخل أنابيب- بيتا الصغيرة (β-tubules)، وتغرس داخل الغشية البكتيرية، وتزيد النفوذية كعوامل مضادة بكتيرية (فرنانديز-لوبيز وآخرون Fernandez- Lopez *et al.*, 2001).



الشكل (٦,٥). (A) مضادّات البِبْتيد الكتيونية التي تغرس في الأغشية. (B) رسم للغرس في الغشاء والتمزيق في البكتيريا السالبة–لغرام (مقتبسة بالإذن من من هانكوك وتشابيل وHancock and Chapple. (١) الببتيدات الكتيونية غير المطوية مصاحبة للشحنة السالبة على الغشاء أو ترتبط بمواقع الربط الكتيوني على الدهن عديد السكريد، لتعبر إلى الغشاء الخارجي. (٢) ومن ثم ترتبط مع الشحنة السالبة على سطح الغشاء السيتوبلازمي ويَغرس لببْتيد amphipathic المطوي داخل الغشاء في السطح الفاصل، (٣) والتجمع بشكل معقدات بشكل مذيلة (جسم مكهرب شبه غروي) أو (٤) تتقلب عبر الغشاء. بعض الببتيدات تستطيع بعد ذلك أن يتفكك من الغشاء إلى داخل السيتوبلازم.

للبوليمكسين (polymyxin) مجموع شحنة +٥ ويصل لكل من الأغشية الخارجية والأغشية الداخلية للبكتيريا السالبة لغرام. توجد طفرات في الجينات المتورطة في أيض عديد السكريد الدهني (lipopolysaccharide) للغشاء الخارجي الذي يزيد المقاومة للبوليمكسين بواسطة دمج أشطر ٤- أمينوأرابينوز (4-aminoarabinose moieties) على الدهن A (lipid A) الأنيوني لإنقاص مجموع شحنته والإنجذاب للكهرباء الساكنة (electrostatic attraction) نحو البوليمكسين (بالتز Baltz, 1997). آلية العمل المقترحة للبِبْتيدات الكتيونية مع الأغشية البكتيرية السالبة -لغرام موضحة في الشكل (٦.٥). ومن المحتمل أن لجميع مضادّات البِبْتيد الدهنية (lipopeptide) بعض مكونات النفوذ للغشاء وتمزيق الغشاء مع فعاليتها الحيوية . فعلى سبيل المثال، فاليبوبِبْتيدولاكتون دابتوميسين (lipopeptidolactone daptomycin) (الشكل ٦.٦)، التي تكون معقد مع أيونات الكالسيوم Ca^{2+}، قد تُظهر جزء من فعاليتها المضادة للبكتيريا من خلال خاصية البحث- عن الغشاء، والسلوك النشط - على السطح (surface-active behavior). والجزء الآخر من عمل دابتوميسين قد يكون بالتحديد عرقلة البناء الحيوي لمكونات حامض تيكويك الدهني (lipoteichoic acid) للأغشية الخارجية للبكتيريا الموجبة - لغرام (بالتز Baltz, 1997). والدابتوميسين هو في المرحلة الثالثة من التطوير السريري لمعالجة العداوى الخطيرة الموجبة - لغرام (تالي ودي برون Tally and DeBruin, 2000).

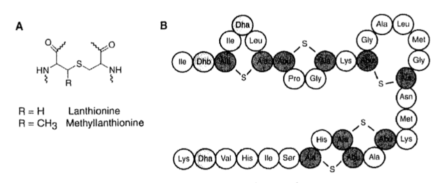
Daptomycin

الشكل (٦,٦). تركيب مضاد ليبوديبسيبِبْتيد (lipodepsipeptide) دابتوميسين (daptomycin).

وبالإضافة إلى مضادّات البيبتبد التي تنتجها المكروبات، يوجد حوالي ٥٠٠ ببتيد معروف منتج بواسطة الكائنات المتعدِّدة الخلايا (انظر زاسلوف Zalsloff للمراجعة) لتعمل كعوامل مضادة مكروبية واسعة - المدى. وهذه تنزع لأن تكون بِبْتيدات خطية (linear peptides) والتي تنشا بواسطة العمل الحال لطلائع البروتين (proteolytic) وتستطيع أن تكون كبِبْتيدات قاصدة- للغشاء، مأيونة من كلا الجانبين (amphipathic) بواسطة تقديم لويحات من السلاسل الجانبية غير- الأليفة للماء (hydrophobic) موجبة الشحنة لغرسها في الأغشية المكروبية عند تراكيز جزيئية دقيقة. وقد يكون تَطوُّر المقاومة بطيء جداً ؛ بسبب آلية الغرس في الغشاء، بينما قد تظهر بعض الانتقائية ؛ بسبب

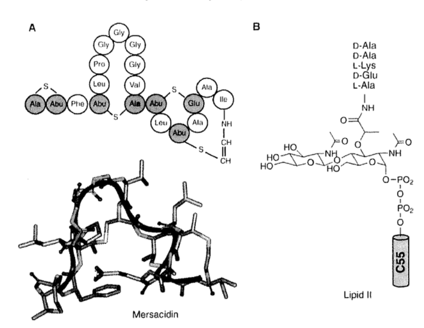
أن للأغشية البكتيريا الخارجية مكونات جزيئية أنيونية أكثر من تلك التي في أغشية الخلايا الحيوانية. والأنسجة الظهارية والخلايا هنالك قد تطلق (كوكتيل) خليط من تلك الببتيدات والتي بإمكانها أن تكون مهمة لآليات المناعة الفطرية. ويظل المطلوب معرفته ما إذا كانت الببتيدات الكتيونية الخطية لعائلات المجنين (magainin) والدفنسين (defensin) ستكون آمنة وفعالة بشكل كاف لتستحق التطوير أبعد من الاستعمال الموضعي (حيث السمية الجهازية تخفف بواسطة طريقة الإعطاء).

أنتجت المجموعة الثانية من الببتيدات ذات فعاليّة المضاد الحيوي بواسطة البكتيريا الموجبة –لغرام وتم تصنيفها بلانتيبيوتيكس (lantibiotics)؛ لأن جميعها تحتوي على ثيوإيثر غير اعتيادي – مزدوج الرأس – يحتوي على حامض أميني لانثيونين (double-headed thioether-containing amino acid lanthionine) (الشكل ٦,٧ A) أو بيتا–ميثيل لانثيونين المماثل (*β*-methyle lanthionine). وهذه بيبتيدات منتجة بواسطة الريبوسوم والمعدلة بعد الإنتساخ لإدخال جسور ثيوإيثر–العابرة (thioether cross-bridges) (الشكل ٦,٧ B)، ومن ثم تنفلق لتزيل إشارة تعاقب N-terminal (انظر هانسن Hansen, 1997، للمراجع، جاك وآخرون Jack *et al.*, 1995) (انظر الفصل الرابع عشر للبناء الحيوي للانتيبيوتك).



الشكل (٦,٧). (A) لانثيونين وميثيل لانثيونين، المكونات الأساسية لبِبْتيدات لانتيبيوتك، (B) خمس روابط – عابرة في نيسين لانتيبيوتك.

تعتبر مضادّات لانتيبيوتك A (type A lantibiotics) بِبْتيدات كتيونية ذات تركيب هندسي لولبي، مطول من كلا الجانبين، amphiphilic، الذي يغرس داخل الأغشية ويعمل كعوامل نازعة للاستقطاب (depolarizing agents) كالبِبْتيدات غير الريبوسومية التي تم ذكرها أعلاه. وعلى العكس، تعتبر أنواع B لانتيبيوتك (type B lantibiotics) بِبْتيدات كرويّة متضامة (compact,globular peptides) (انظر الشكل ٦,٨ لتركيب ميرساسيدين، mersacidin). وتم الإخبار أن كل من ميرساسيدين ونيسين Z (mersacidin and nisin Z) يكوّن معقد مع الدهن II (الفصل الثالث)، بالرغم من أن تفاصيل ذلك التفاعل لم يتم معرفتها. وبالمثل ففضالة (بقية) ١٩ اكتيجارد (19 residue actigardin) تعرقل البناء الحيوي لجدار الخلية ربما عند مراحل الدهن I / II.



الشكل (٦,٨). (A) التركيب الأولي وثلاثي الأبعاد لميرساسيدين (من شنيدر وآخرون، (٢٠٠٠) و (B) الدهن II الجزئ الهدف.

مجموعة من مضادّات البِبْتيد المكروبية الغنية بالبرولين، التي عزلت أساساً من الحشرات يعتقد أن تكون قد أُخذت بواسطة مضخات ناقلة ببتيد المصدرة إلى داخل السيتوبلازم البكتيري وتتفاعل مع أهدافها النهائية داخل الخلايا البكتيرية. أحد هذه الببتيدات، بيرهوكوريسين (pyrrhocoricin) (كراجول وآخرون Kragol *et al.*, 2001)، هو ٢٠- فضالة البِبْتيد الخطي (20-residue linear peptide) تم إضافة السكريات له (glycosylated) على ثريونين واحد (threonine) بواسطة الحشرات المنتجة. ولا يتطلب وجود السكر للفعاليّة المضادة للمكروبات وقد تبين أن ٢٠-فضالة البِبْتيد يرتبط مع 70-kDa بروتين الصدمة الحرارية البكتيري شابيرون DnaK (70-kDa bacterial heat shock chaperone protein DnaK) للاشريكية القولونية ويعرقل فعاليّة إنزيم ATPase. وهذا يقطع طية وفعاليّة شابيرون لـ DnaK. ولقد إفترض كراجول وآخرون Kragol *et al.*, 2001، أن بيرهوكوريسين والبِبْتيدات الغنية بالبرولين ذات العلاقة مثل دروسوسين (drosocin) وأبيداسن (abidaecin) تقتل البكتيريا بواسطة عرقلة فتح وإغلاق الغطاء الحلزوني لجيب DnaK المرتبط، الضروري لطي البروتينات في جيب شابيرون الرابط. وهناك جدل حول تصميم الببتيدات المضادة للمكروبات النوعية السلالة والبِبْتيدات المشابهة معتمداً على التعاقبات المختلفة لـ DnaK في المُمْرضات المستهدفة.

الريفاميسينات (Rifamycins) في الدرن (السل)

الريفامبين (ويعرف كذلك بالريفامبيسين) هو نسخة شبه مصنعة للريفاميسين B (rifamycin B) (الشكل ٦,٩)، المنتج الطبيعي لصنف المضاد الحيوي أنساميسين (ansamycin)، المعزول أساساً من الشعية المعروفة المتسلسلة المتوسطية

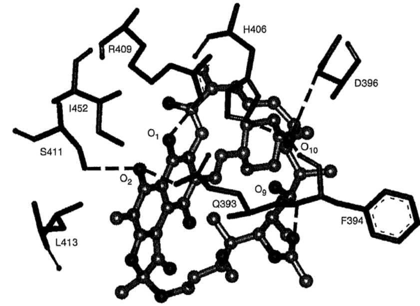
(Streptomyces mediterranei) والتي صنفت مؤخراً بالنوكارديا المتوسطية *(Nocardia mediterraniae)* (لانسينسي Lancini, 1983). ويعني اسم أنسا (ansa) (مقبض) (handle) مشيراً إلى سلسلة دهنية (aliphatic chain) التي تشغل بين مراكز التوصيل غير المتجاورة على هيكل نفثالين (naphthalene) المُستبدل.

Rifampin

الشكل (٦،٩). تركيب دواء الريفامبين من عائلة ريفاميسين المضاد للدرن.

ويُستعمل الريفامبيسين سريرياً فقط كجزء من توليفة النظم لقتل المُمْرضة المتفطرة السلية (*Mycobacterium tuberculosis)* بطيئة – النمو. والدواء يعتبر مثبط لأنزيم رنا بوليميراز (RNA polymerase)، الوحيد في الاستعمال السريري لعرقلة الإنتساخ البكتيري (bacterial transcription). ولحافز البلمرة رنـا البكتيري لب رباعي (core tetramer) من الوحدات الفرعية $\alpha_2\beta\beta'\gamma$ والوحدة σ الفرعية القابلة للتفكك التي توجه لب البوليميرازلينتسخ صنف معين من الجينات. وبإمكان عوامل σ المختلفة أن تظهر في البكتيريا تحت ظروف نمو مختلفة كآلية واحدة لاستهداف حافز البلمرة اللب لإنتساخ وحدات فرعية متميزة من الجينات. ويرتبط الريفامبين بالوحدة الفرعية *β* لإنزيم رنا حافز البلمرة عند الموقع التجسمي المتباين (allosteric site) وليس عند الموقع النشط (كامبل وآخرون Campbell *et al.*, 2001) كما حُدد بواسطة الطفرات المقاومة في العزل السريري للمتفطرة السلية والمتفطرة الجذامية *(M.leprae)* (سبرات Spratt, 1994، توني وآخرون Toney *et al.*, 1998). ومؤخراً تم تحديد تركيب أشعة–إكس لثيرمس المائية (*Thermus aquaticus) (Taq)* لب حافز البلمرة رنا، معقد $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ‎400-kDa، مع الريفاميسين المرتبط (كامبل وآخرون Campbell *et al.*, 2001) (الشكل ٦،١٠) وتمت المصادقة على أن الريفاميسين يثبط مباشرة سلسلة رنا المطولة بواسطة الإرتباط في نفق دنا / رنا DNA / RNA للوحدة الفرعية *β*، بحوالي ١٢Å بعيداً من موقع البلمرة للريبونيوكليوسيد ثلاثي الفوسفيت (ribonucleosides triphosphate) الوارد. ويرتبط الريفاميسين بواسطة تفاعلات السلسلة الجانبية رهابية الماء (hydrophobic side chain) نحو فضالات الوحدة الفرعية *β* وبواسطة روابط الهيدروجين نحو مجموعات OH– الأساسية عند المواضع ١و٢، ٩ و ١٠ للمضاد الحيوي. ويُظهر الشكل كيف أن تثبيط تطويل RNA بواسطة الارتباط مع الريفاميسين يثبط انتقائياً التطويا عند مرحلة ثنائي أو ثلاثي نيوكليوتيد (di- or trinucleotide stage). للعزل السريري

من المتفطرة السلية المقاومة للريفاميسين طفرات عند فضالات الوحدة الفرعية β التي تميز الريفاميسين، بحوالي ثلاثة أرباع المقاومة الناشئة من الطفرات في السلاسل الجانبية للفضالات ٤٠٦ و ٤١١ (سبرات Spratt, 1994). يعتبر تَطوُّر المقاومة سريع نسبياً إذا استعمل الريفامبين كعامل معالجة وفرد (هييب وآخرون Heep *et al.*, 2000)، مما يفسر أحد أسباب ت المعالجة التوليفية المستعملة للدرن (انظر الفصل الحادي عشر لتشولار وبرات Scholar and Pratt, 2000). إن ٥٠٪ التركيز المثبط (50% inhibitory concentration) ضد حافز البلمرة رنا المتفطري هو في حدود 0.005 إلى 0.1 ميكروجرام / مل كما أن حوافز بلمرة رنا لسويات النواة تبلغ على الأقل ١٠٠- طية أقل حساسية.



الشكل (٦,١٠). موقع الربط للريفاميسين على البروتين المستهدف، الوحدة الفرعية β لحافز بلمرة رنا. (من كامبل وآخرون Campbell, 2001).



المقاومة للمضاد الحيوي
ANTIBIOTIC RESISTANCE

يبحث الباب الثالث المقاومة للأدوية المضادة البكتيرية التي تمت مناقشتها في القسم الثاني. يعرض الفصل السابع موضوع المقاومة في المكروبات المنتجة – للمضاد الحيوي التي يجب أن تكون قد طورت آليات حماية ذاتية لتتجنب التدمير الذاتي أثناء إنتاج المضاد الحيوي. والآليات الهامة الداخلية الثلاثة في منتجي المضادّات الحيوية هي : (١) تعطيل نشاط المضاد الحيوي، (٢) تدفق المضاد الحيوي، و(٣) تحوير الهدف الجزيئ الحساس. وهذه الآليات تنذر المقاومات التي تكتسب عندما تصبح الممرضات البكتيرية مقاومة. ويتناول الفصل الثامن تعطيل نشاط المضادّات الحيوية في نطاق كل من التحلل المائي للبيتا– لكتام والتعديل التساهمي للأمينوغليكوسيد. ويفصل الفصل التاسع عوائل من مضخات التدفق (efflux pumps) الموجودة في الممرضات. ويشرح الفصل العاشر التعديلات على البروتين في البروتينات – المرتبطة بالبنسيلّين التي تقع تحت النمط الظاهري للمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRSA)، ومثيلة (methylation) 23S Rrna المنتشر في مقاومة الإريثروميسين، وإعادة برمجة وسائط الببتيدوغليكان في المقاومة للفامكوميسين.

البكتيريا	حالات الوفيات	٪ العزل المقاوم لـ المثيسيلين	الفانكوميسين
المكورة العنقودية السالبة – للكواجيوليز	٪٢١	٪٨٠	-
المكورة العنقودية الذهبية	٪٢٥	٪٣٠	-
المكورة المعوية البرازية	٪٢٥	-	٪٢٠

ورود وخطورة العداوى المقاومة للمشيلين والفانكوميسين. – لم تحدد.

الفصل السابع

المناعة الطبيعية والمنتجة مقابل المقاومة المكتسبة
NATURAL AND PRODUCER IMMUNITY VERSUS ACQUIRED RESISTANCE

أثناء الخمس إلى ستة عقود التي مافتئت فيها المضادّات الحيوية تتسع للعلاج، والتي تبعها تَطوُّر المقاومة للمضادّات الحيوية. والمشاهدة التاريخية وهي أنه كلما أدخل مضاد حيوي جديد، أشكال أوسع- المدى من المضادّات القائمة، أو صنف جديد من المضادّات الحيوية للاستعمال الواسع بين الناس، تظهر المقاومة المعتدة سريرياً. وربما تكون في غضون شهور (اكتشفت المقاومة للبنسيلّين في وقت مبكر مثل ١٩٤٥م) وقد تستغرق سنوات: المقاومة للفانكوميسين أخذت ما يقارب ٣٠ سنة (١٩٨٧م) بعد الإدخال السريري (١٩٥٤م). والتأخير الطويل ربما كان بسبب الاستعمال المحدد للفانكوميسين في السنوات الخمس وعشرون الأولى، ولكن عند تقدمه لخط المعالجة الأمامي، ظهرت المقاومة. وكذلك وكما سنلاحظ في الفصل العاشر، بينما المقاومة السريرية المعتدة لمضادّات للبيتالكتام قد تحدث من خلال عمل أحد منتجات الجين، فإنزيم البيتالاكتاماز الحال بالماء (hydrolytic β-lactamase)، النمط الظاهري للمكورة المعوية المقاومة للفانكوميسين (vancomycin –resistant enterococcus (VRE) phenotype) يتطلب وجود كاسيت (حافظة) (cassette) خمس –جينات ليتم تجميعها. وتستطيع فاشيات المقاومة أن تكون مبعثرة جغرافياً ولجميع أصناف المضادّات الحيوية الهامة. يبين الشكل (٧.١) خارطة الفاشيات في الولايات المتحدة خلال فترة ١١ سنة من ١٩٨٣ — ١٩٩٤م للممرضات المقاومة لكل من البنسيلّين والكيفالوسبورين، للفلوروكوينولون السبروفلوكساسين، إلى الماكروليد الإريثروميسين، وإلى الجليكوبيبتبد (البِبْتيد السكري) الفانكوميسين. وأنماط مماثلة استمرت منذ ١٩٩٤م، كما سنلاحظ في الفصل السابع عشر.

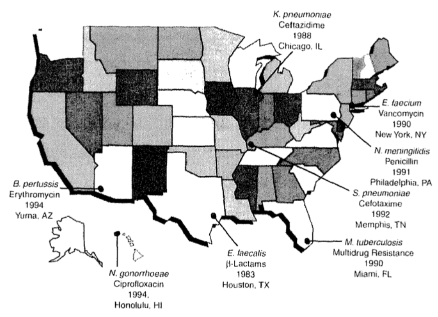
البكتيريا المقاومة – للمضادّات الحيوية تم انتقاؤها في بيئات المستشفى أسرع بكثير من المجتمع الخارجي. يوجد في المستشفيات أساساً تعرُض مركَز وثابت للبكتيريا للمضادّات الحيوية. وفي هذه البيئات الدقيقة يوجد ضغط انتقائي (selective pressure) للبكتيريا المقاومة للمضاد الحيوي للمحافظة على هذه المُحددات، للبقاء، وحتى لتسود الجمهرة البكتيرية. ففي الجمهرة البكتيرية الكبيرة، مثلاً 10^8، التي تعرضت للدواء، يوجد تنافس موت جميع البكتيريا وتَطوُّر الطفرات النادرة التي تُحدث المقاومة. وإذا أخذنا زمن التكرار القصير لانقسام البكتيريا (يبلغ أقصر حد من ٢٠ – ٣٠

دقيقة) والتكرر النوعي لخطأ واحد لكل ١٠^٧ قواعد كلما نسخ بوليميراز دنا DNA polymerase واحد دنا ، وبعد ذلك فإن ١٠٠ مليون بكتيريا سوف تحتوي على حوالي ١٠ طفرات في الجمهرة. فإذا تفرقت هذه الطفرات عشوائياً في مجين البكتيريا بحجم الإشريكية القولونية ، ذات ٣٠٠٠ جين ، بعد ذلك ٠,٣٪ (١٠/٣٠٠٠) من الجينات سوف يكون لديها طفرة واحدة. وإذا كان أحد طفرات هذا الجين في الهدف للمضاد الحيوي والطفرة سوف تحدث بعض درجة من المقاومة التي تجعل البكتيريا أقل حساسية ، وعلى إثر ذلك سوف يكون لديها ميزة البقاء الانتقائي (selective survival). وبموت جيرانها الحساسين ، فسوف تبقى ويكون لها مكان للنمو وتسود المستنبت (المزرعة) وقد تنتشر بفعاليّة.

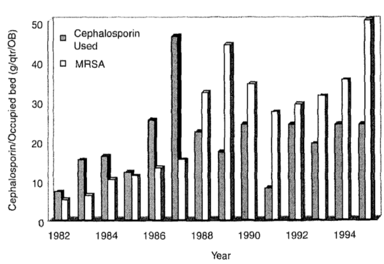
إضافة إلى النشوء المستقل لطفرات النقطة (point mutations) لتكوين جينات مقاومة ، هذه الجينات تستطيع أن تتجمع على عناصر دنا قابلة للانتقال (الترانسبوسونات) (الينقولات) (transposons) ، التي تعد عناصر جينية متحركة التي تستطيع أن تنتقل بين عناصر تعاقب الـ دنا على كل من عناصر متحركة أكبر (البلازميدات) (plasmids) وعلى الكروموسوم البكتيري (ينقولات اقترانية) (conjugative transposons) (انظر ويتلي وآخرون Whittle *et al.*, 2001). وهكذا فالجين المسئول عن النمط الظاهري VanA لمقاومة الفانكوميسين يوجد بشكل نموذجي على الينقول المرسَّخ في البلازميد في خلايا VRE. وبشكل مماثل ، غالباً البيتالاكتاماز TEM-1 ما يُحمَّل بواسطة الينقول TN3 (آميز Amyes, 2001). تستطيع عناصر البلازميد بحجم دنا أن تندمج داخل مواقع ارتباط معينة على الكروموسومات لتكوين جزر مقاومة للمضاد الحيوي ، كالموجودة في السالمونيلا المعوية ضرب تيفيميوريم (*Salmonella enteric* serovar Typhimurium DT104) (الفصل السابع عشر) والمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA) (هذا الفصل). وهذا يسمح بالمحافظة على العديد من جينات المقاومة معاً. وجميع هذه الطرق تساعد على الانتشار السريع والمحافظة الثابتة لمجموعات الجينات المقاومة للمضاد الحيوي خلال جمهرة البكتيريا. ولقد وصفت (جين وآخرون Jain *et al.*, 1999) الانتقال الأفقي المكثف للجين بأنه هو عملية مستمرة في البكتيريا.

السلالات المقاومة سوف تستمر لأن تكون منتقاة بواسطة الوجود المستمر للمضاد الحيوي في البيئة الدقيقة ، مثال ، في جناح المستشفى. يُظهر الشكل (٧,٢) علاقة واضحة ومؤقتة على فترة ١٢ سنة بين استعمال الكيفالوسبورينات ونشوء MRSA (هيراماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001). وبإمكان هذه التأثيرات أن تحدث كذلك في فترة زمنية مضغوطة. فعلى سبيل المثال ، يعطى المريض المنوم للجراحة مضادّات حيوية للتوقية ومن ثم ولأيام قليلة بعد الجراحة للتقليل من احتمالية المضاعفات العدوائية. ودراسة تاريخ التزريع الأنفي في مثل هؤلاء السكان من المرضى (الشكل ٧,٣) ، أشارت أنه في رحلة الانتشار يحتوي حجم الجزء المكافئ المعطى على ١٠^٥ من بكتيريا المكورة العنقودية الذهبية ، أساساً جميعها حساسة للمثسلين (MSSA) (تشينتاج وآخرون Schentag *et al.*, 1998). وبعقب الجراحة والمعالجة بواسطة كيفازولين (cefazolin) (نوع من الكيفالوسبورين) ، ٩٠٪ من المرضى كانوا أُرسلوا إلى البيت بعد يومين بعد الجراحة ، وبدون مضاعفات عدوائية. وكان العد الأنفي البكتيري أقل بـ١٠٠– طية إلى ١٠^٣ وكان خليط من المكورات العنقودية الحساسة ، المقاومة – الحدية (borderline) والمقاومة. وللمرضى الذين مازالوا في

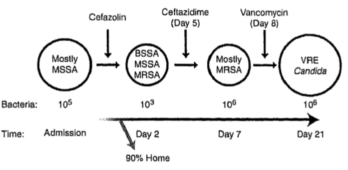
المستشفى وكانوا تحولوا في اليوم الخامس إلى كيفالوسبورين آخر (سيفتازيديم) (ceftazidime)، فعندما تمت المقايسة في اليوم السابع، كان قد ارتفع العد البكتيري أعلى من ١٠٠٠ – طية إلى ١٠^٦ وكان معظمها MRSA. هؤلاء المرضى قد تم تحويلهم بعد ذلك إلى كورس فانكوميسين لمدة أسبوعين، ولهؤلاء الذين ما زالوا في المستشفى في اليوم ٢١، أظهر التزريع الأنفي ١٠^٦ VRE وبعض المُبيِّضة *(Candida)*. وبسبب الزمن القصير لانقسام البكتيريا، فالانتقاء – لمقاومة الدواء، والمُمْرِضات – المهددة للحياة قد يكون سريع وبشكل بارز.



الشكل (٧,١). الفاشية الحديثة للبكتيريا – المقاومة للمضاد الحيوي في الولايات المتحدة خلال فترة –١١ سنة ١٩٨٣–١٩٩٤م.



الشكل (٧,٢). زمن تَطوُّر المقاومة للكيفالوسبوريز بواسطة MRSA.



الشكل (٧,٣). تقدم الجمهرة البكتيرية في مرضى الجراحة من MSSA إلى MRSA إلى VRE في ثلاثة – أسابيع فترة زمنية محددة. (بالإذن من تشينتاج وآخرون Schentag *et al.*, 1998).

وبالرأي السابق الذكر، تعدُّ المقاومة البكتيرية للمضاد الحيوي ليست موضوع" إذا" ولكن فقط موضوع "متى". وهذا المنطق بأنه سيكون هناك حاجة ثابتة دورات من اكتشاف وتَطوُّر مضادّات حيوية جديدة. وبمجرد إدخال المضاد الحيوي للاستعمال السريري الواسع الانتشار، فإن انتقاء الكائنات المقاومة سوف يبدأ والفترة العلاجية المحدودة سوف تحدث قبل أن تصبح مقاومة المُمْرض واسع الانتشار بشكل كافٍ لتقلل فعاليّة ذلك الدواء. بعد ذلك سيكون هناك حاجة للجيل التالي (مثال، نحن عند الجيل الرابع للكيفالوسبورينات والجيل الثالث من الإريثروميسينات) أو أصناف جديدة كاملة من المضادّات الحيوية. وهذا يفسر أكثر بقائمة البكتيريا في الجدول (٧,١) المقاومة لأصناف مختلفة من المضادّات الحيوية المستعملة سريرياً. وتتوفر المراجعة الحديثة للطرق لتقييم المقاومة المكروبية بواسطة كوكريل (Cockerill, 1999).

والعديد من المضادّات الحيوية التي تم تطويرها إلى أدوية مضادة للبكتيرية مُثَبِّتَة تراكيز دنيا مثبطة (MICs) أو في بعض الأحيان تراكيز ٥٠٪ مثبطة، وغالباً في مقايسات أطباق بتري (Petri plate assays)، في حدود ١ ميكروجرام / مل. وللمضادّات الحيوية ذات الأوزان الجزيئية أقل من ٥٠٠ جرام/ مول، سيكون ذلك في نطاق تركيز ٢⁻ ميكرومول، وعلى سبيل المثال، فإن ٥٠٪ التراكيز المثبطة للأوكسازوليدينون (oxazolidinones) للكائنات الحساسة تكون في نطاق ١-ميكروجرام/مل، بينما تتراسيكلين MIC حول ٠,١ ربما يكون نموذجياً. وغالباً ما يكون MIC للفانكوميسين في نطاق من ٠,١ – ٠,٥ ميكروجرام/مل، و MIC للكوينولونات مثل السبروفلوكساسين أفيد أنه في نطاق من ٠,٠٥ – ٠,٥ ميكروجرام / مل للكائنات الحساسة. وربما يكون MIC للميكروليدات من عائلة الإريثروميسين في نطاق ٠,٠١ – ١ ميكروجرام / مل. ولقد تُرجمت القوى إلى نطاقات جرعات لمعالجة مفيدة لمعالجة العداوى في الإنسان. وكما أن البكتيريا تَطوُّر محدِّدات وآليات لمقاومة المضادّات الحيوية، فعندما يصل أو يتعدى MIC ٨ ميكروجرام/مل، قد يصنف الكائن كمقاوم متوسط (معتدل). والكائنات التي لها MIC أعلى من ٣٢ ميكروجرام/مل عموماً تعدُّ مقاومة سريرياً للمضاد الحيوي.

الجدول (٧,١). المقاومة البكتيرية لمختلف أصناف المضادّات الحيوية المستعملة سريرياً.

المضاد الحيوي	الصنف التركيبي	الهدف	الطفرة/ بلازميد	تدفق	مسام	تعطيل النشاط	تغيير الهدف
أمبسيلين	بنسيلّين	E	+/ +	√	√	√	√
سيفترايكسون	كيفالوسبورين	E	+/ +	√	√	√	√
إميبينيم	كاربابينيم	E	+ / +	√	√	√	√
فوسفوميسين	حامض الفوسفوريك	E	+ / +		√	√	
جنتاميسين	امينوغليكوسيد	R	+ / +	√		√	√
كلورامفينيكول	فينيل بروبانويد	R	+ / +	√		√	√
تتراسيكلين	بوليكيتيد (II)	R	+ / +	√		؟	√
إريثروميسين	ماكروليد	R	+ / +	√		√	√
كلنداميسين	لينكوسميد	R	+ / +			√	√
سينيرسيد	ستربتوجرامين	R	+ / +	√		√	√
تليثروميسين	كيتوليد	R	+ / +	√		√	√
سبروفلوكساسين	فلوروكوينولون	D	+ / +	√			√
فانكوميسين	غليكوببتيد	E	+ / +				√
سلفيسوكسازول	سلفوناميد	M	+ / +				
ترامیثوبريم	–	M	+ / +				
ريفامبين	أنساميسين	P	+ / +			√	√
حامض الفيوسيدك	ستيرويد	T	+ / +	√			√
لينيزوليد	أوكسازوليدينون	R	+ / −				√
نوفوبيوسين	كومارين	D	+ / +				√
أيزونيازيد	–	M	+ / −				
بيرازيناميد	–	M	+ / −				
نيتروفيورانتوين	نيتروفيوران	M	+ / −			(√)	
بوليميكسين	ببتيد	E	+ / −	√			√
كابريوميسين	ببتيد	R	+ / −			√	√
ميوبيروسين	حامض السودومونيك	T	− / +				√

D: تكرار، E: غلاف، M: أيض، P: حافز البلمرة رنا، R: ريبوسوم، T: ترجمة، –: صنف تركيبي غير معياري.

مقتبسة من ملصق عن آليات عمل ومقاومة المضادّات الحيوية، سي. والش، جاي. تروجر، بي. كورفالين، جاي. ديفيس (٢٠٠١)، اتجاهات في الأحياء الدقيقة، لانسيت للأمراض المعدية (The Lancet Infectiuos Disease)، الرأي الحالي في الأحياء الدقيقة (Current Opinion in Microbiology)، اتجاهات في الطب الجزيئي (Trend in Molecular Medicine).

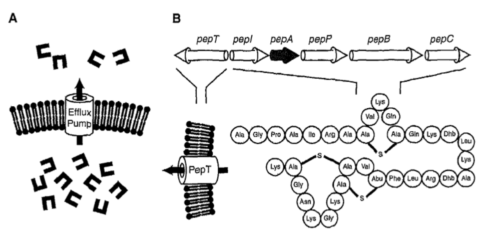
كيف تفلت منتجات المضادّات الحيوية من تدمير نفسها؟

لقد لاحظ كثير من المراقبين أن منتجات المضادّات الحيوية يمكن أن تكون عرضة لأسلحتها الكيميائية المدمرة ويجب أن تكون قد وضعت إستراتيجيات لحماية ومناعة نفسها. وقد أدى ذلك إلى المبدأ العام بأن الجينات الخاصة

بمقاومة المضادّات الحيوية والآليات يجب أن تكون قد تَطورت بالمشاركة مع القدرة على التصنيع الحيوي للمضاد الحيوي في الوقت المناسب فقط لخطة الحماية الذاتية. وفي القسم التالي من هذا الفصل سوف نفحص بعض الأمثلة التي تسلط الضوء على آليات الحماية الذاتية المختلفة التي تعمل مع البكتيريا المنتجة للمضاد الحيوي والتوقيت الذي يفتح الحماية عندما يتم الاستعداد لإنتاج المضاد الحيوي.

وكقاعدة عامة، على الرغم، فإن المضادّات الحيوية المنتجة طبيعياً تصنع بواسطة الآلآت الإنزيمية داخل الخلايا البكتيرية والمضادّات الحيوية الناضجة هي جزيئات مُفرزة. وعتاد كل منتجات المضادّات الحيوية تقريباً التي تم فحصها تشمل واحداً أو أكثر من مضخات بروتين خلال الغشاء (transmembrane protein pumps) ويفترض أن تكون مكرسة لضخ المضادّات الحيوية للخارج بمجرد صنعها وقبل أن تتراكم إلى تراكيز ضارة داخل الخلية المُنتجة (الشكل ٧,٤ A).

وعندما يتم تعاقب (تسلسل) مجموعة من جينات المضاد الحيوي، عادة ما نجد الجينات التي تُرمِّز (تُشفر) مثل مضخات تصدير المضاد الحيوي هذه داخل المجموعات الناسخة، لتضمن تنسيق إنتاج مضخات التصدير بمجرد التفاف المضادّات الحيوية بعيداً عن خطوط التجميع الإنزيمية (الفصلان الثاني عشر والثالث عشر). في مجموعة Pep لانتي بيوتك، يرمز *PepA* طليعة ببتيد المضاد الحيوي ويرمز *PepT* المضخة. وقد يكون عديد من المراحل المتأخرة لتجميع المضاد الحيوي، مثال ذلك، معقد البروتين الذي يصنع بروتينات لانتي بيوتكس (بروتز وسهل Brotz and Sahl,2000) (الشكل ٧,٤ B)، يقترن جسدياً في الغشاء إلى المضخات بحيث أن تصنيع المضاد الحيوي وتوجيه التدفق من السيتوبلازم البكتيري يقترنا حركياً.



الشكل (٧,٤). رسوم تخطيطية لمضخات بروتين تدفق المضاد الحيوي: (A) مخطط عام، (B) وظيفة مضخات تدفق مضادّات لانتي بيوتكس.

إن وجود جينات في منتجات المضادّات الحيوية التي توفر مقاومة داخلية أو مناعة ذاتية توفر كذلك مخازن كامنة لهذه الجينات التي ستكون مُكتسبَة، من خلال مختلف آليات نقل الجين، بواسطة البكتيريا الموجودة في

الأهداف المقصودة من المضادّات الحيوية. وبالنظر في مخازن الجينات المقاومة، فمختلف الينقولات وغيرها من العناصر الجينية المتحركة التي تعمل كأدوات نقل، والضغط الانتقائي للبكتيريا للبقاء في البيئة الدقيقة – الغنية بالمضاد الحيوي بمجرد أنها اكتسبت جينات المقاوم، فإنه من المتوقع أن سرقة هذه الجينات سيكون طريق مشترك لاكتساب المقاومة. وسوف نرى ذلك ممثلاً بوضوح وخاصة عند مقارنة خطة الحماية الذاتية في منتجات مضادّات الغليكوببتيد الحيوية والآلية التي تصبح بها المكورات المعوية المُمْرِضة مقاومة للفانكوميسين (VRE).

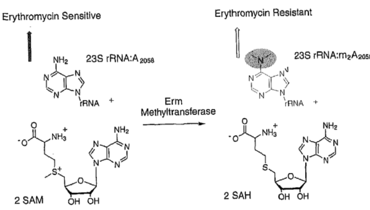
الحماية الذاتية في منتجي الميكروليد

تنتج المتسلسلات (Streptomycetes) معظم مضادّات الميكروليد الحيوية المستندة على البوليكيتيد (polyketide-based)، وتشمل الإريثروميسين ، وحلقة العضوية– ١٤ ذا العلاقة ميكروليد أولياندوميسين (14- membered ring macrolide pleandomycin) وحلقة العضوية–١٦ تيلوسين المُناظر (tylosin homolog) (الشكل ٧,٥، وكذلك انظر الجدول ١١,١). يختلف أولياندوميسين عن الإريثروميسين في التعديل الإنزيمي للموضع C_8-CH_3 إلى الإيبوكسيد (epoxide). وقد تم وصف ثلاث إستراتيجيات للمقاومة الذاتية في منتجات الميكروليد وآليات الإنذار للمقاومة المكتسبة في ممرضات الإنسان. التعديل الأول، بواسطة عمل الترادف لميثيل تراسفيريز Erm (Erm methyltransferase) من المجموعة الأمينية خارجية الحلقة (exocyclic amin group) من أحد فضالات الأدينين (adenine residue)، A_{2058}، في 23S RNA، في المثيلة الأحادية، أو الثنائية (المَثْيَلة الأحادية أو الثنائية mono- or dimethylation). وهذه المَثْيَلة —ن (N-methylation) تتعارض من ربط الإريثروميسين مع ذلك الموقع عالي– الانجذاب على الريبوسوم 50S (الشكل٧,٦، انظر كذلك الفصل الرابع). وتوجد آلية المقاومة هذه في منتِجات الإريثروميسين وتيلوسين (فييرو وآخرون Fierro *et al.*, 1987، كويروس وآخرون Quiros *et al.*, 1889) ولكن ليس في منتِجات أولياندوميسين. الآلية الثانية هي إظهار بروتينات النقل لتصدير — الميكروليد، المدعومة بالتحلل المائي لـ ATP وتعرف بالكاسيت الرابط لـ ATP (ATP-binding cassette) من نوع البروتينات (ABC). والتأكد من وظيفة ضخ التصدير تأتي من زيادة إظهار (overexpression) لبروتينات (ABC) وزيادة المقاومة للإريثروميسين، التي تمت مناقشتها أيضاً في الفصل التاسع.

الآلية الثالثة للمقاومة الذاتية، والتي تم فك شفرتها بواسطة سالاس (Salas) وزملائه (كويروس وآخرون Quiros *et al.*, 1998) في المتسلسلة أنتيبيوتكس *(Streptomyces antibioticus)* المنتجة للأولياندوميسين، المشاركة في التعديل الإنزيمي في نهاية مسار البناء الحيوي لتبقي الميكروليد في الشكل غير الفعال بينما ما تزال في داخل الخلية. القطعة المتممة لهذا الرسم الرائع لحماية – الذات هي أنه بمجرد أن يفرز الميكروليد فإنه يجري نحو الإنزيم خارج الخلية والتي بدورها تحوله إلى شكله الفعال. مجموعة الحماية العابرة هي مجموعة غلوكوزيل (glucosyl group) مشفرة بواسطة إنزيم غلوكوزيل ترانسفيراز (glucosyltransferase)، *oleI*، داخل مجموعة جين أوليااندوميسين.

ويظهر الشكل (٧,٧) أن OleI جلوكوترانسفيريز يستعمل UDP- غلوكوز وغلوكوزيلات (glucosylates) C_2-OH من سكرديسوسامين (desosamine suage) المرافق لـ C_5 للماكرولاكتون (macrolactone) في منطقة محددة. والماكروليد الناتج، الموجود الآن مع ديسوامينيل– ٢,١ غلوكوز ثنائي السكريد (desosaminyl-2,1-glucose disaccharide) عند C_5، يعتبر غير فعال كمضاد حيوي؛ بسبب أن شطر غلوكوزيل (glucosyle moiety) التي تم إدخاله يعرقل الربط مع الوحدة الفرعية 50S للريبوسوم. وهذا لن يحدث ضرراً لخلية المتسلسلة انتيبيوتيكس المنتجة، حتى لو تراكمت إلى مستويات سامة قبل أن يتم ضخها خارجاً بواسطة نوع مضخة– ABC، البروتين OleB.

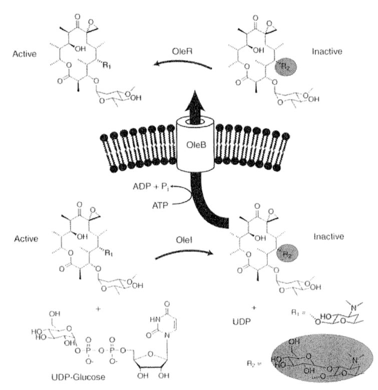
الشكل (٧,٥). تراكيب مضادات الميكروليد الحيوية الإريثروميسين A، أوليااندوميسين، وتيلوسين.



الشكل (٧,٦). الأمثلة الأحادية – والثنائية الإنزيمية لـ A_{2058} في 23S rRNA في المقاومة للإريثروميسين. SAM، إس– أدينوسيل ميثيونين، SAH، إس– أدينوسيل هوموسيستين.

ومن ناحية أخرى – فهذا الميكروليد المحتوي على سكر – ثلاثي، حتى لو تم شحنه خارجاً، فهو كذلك غير سام لأي من البكتيريا المجاورة. ولإعادة تفعيل الخواص المضادة الحيوية لجلوكوسيل – أوليااندوميسين الكامن

هذا، فسوف تفرز المتسلسلة أنتيبيوتكس كذلك غليكوسيداز (glycosidase) وهو ناتج جين *oleR* (كويروس وآخرون Quiros *et al.*, 1998)، والذي الآن يزيل الغلوكوز بالتحلل المائي (hydrolytically) وينتج شكل أولياندوميسين القادر على أن يرتبط مع 50S ريبوسوم (الشكل ٧,٧). ويبدو أن آلية الشرك (decoy mechanism) هذه لا تتبع بواسطة سكاروبوليسبورا إريثري *(Saccharopolyspora erythraea)*، على الرغم من أن إنزيم EryBI يعدُّ مشابه لـOleR، مما يوحي بأنه في وقت واحد، إستراتيجية الارتباط بالغليكوزيل (glycosylation) (في الداخل) ونزع الغليكوزيل (deglycosylation) (في الخارج) قد تكون في العمل في بعض مراحل التطوُّر للمنتجين للإريثروميسين، وربما قبل أن تصبح مضخات التصدير الأمثل أو أن تتطور إستراتيجية ميثيلاز rRNA (rRNA methylase)، التي توجد في *S.erythraea* وليس في *S.antibioticus*. إحدى المميزات الأخيرة الملاحظة في حماية الذات في *S.antibioticus* هو أن مضخة OleB نقل / تدفق (OleB transport / efflux pump) سوف تضخ غليكوزيل – أوليااندوميسين للخارج. كما أنه لم يحدد إلى الآن ما إذا كان لـ OleB انجذاب قليل للأوليااندوميسين نفسه، بمجرد أن نزع الغليكوزيل (deglycosylated) في الوسط خارج الخلية بواسطة OleR. كما أن الانجذاب الأقل لإعادة امتصاص الأوليااندوميسين من شأنه يؤثر على التدفق الصافي لنظام الضخ ليرسل غليكوزيل – أوليااندوميسين خارج الخلية.



الشكل (٧,٧). الإستراتيجية للحماية – الذاتية بواسطة منتجي الأوليااندوميسين: ارتباط بالغليكوزيل داخل الخلية إلى طليعة أوليااندوميسين غير– فاعل بواسطة OleI، التصدير بواسطة مضخة OleB، وإعادة التفعيل بواسطة غليكوسيدات OleR.

يتعين الانتظار لنرى كيف يكون حجب المضادّات الحيوية داخل الخلية عاماً بواسطة الارتباط بالغليكوزيل (glycosylation) أو التعديل التساهمي آخر. وهناك إشارة بأن وسائط خارج — المسار في مسار البناء الحيوي للمضاد الحيوي باهليميسين غليكوبتيد (bahlimycin glycopeptide) هي glycosylated في ما قد يكون مراقبة وظيفية وقائية (بيشوف وآخرون Bischoff *et al.*, 2001). وكما سيتم شرحه في الفصل الرابع عشر، يوجد منطق للمشابهة في منتجي إستربتوميسين حيث يكون إستربتوميسين داخل الخلية غير فاعل بسبب الفسفرة (phosophorylation) التي تُزال إنزيمياً بعد التصدير.

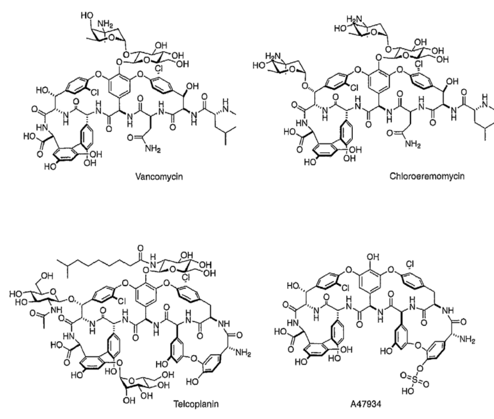
الحماية – الذاتية في منتجي أمينوكيومارين (aminocoumarin)

في البناء الحيوي لمضادّات أمينوكيومارين الحيوية المستهدفة – للجيريز (الفصل الخامس)، من المرجح أن حلقة كيومارين قد تكون تولدت نسبياً مبكراً في مسار البناء الحيوي (انظر الفصل الرابع عشر)، ولذلك فإن العديد من الوسائط في الطريق إلى نوفوبيوسين (novobiocin) من الممكن أن تكون مثبطات كامنة للإنزيم المستهدف، دنا غايراز. ولقد تم اختبار المتسلسلات المنتجة للحساسية لدنا غيراز وتم ملاحظة المقاومة الداخلية. كما أن خريطة المحددات للوحدة الفرعية GyrB من المحتمل أن تكون طفرات موقع ربط ATP المديدة والتي تضعف الحساسية الموقع لربط النوفوبيوسين (تساي وآخرون Tsai *et al.*, 1997). هذه حالة لتعديل الهدف بواسطة الطفرة لاستعادة الفعاليّة الحفّازة الأساسية بينما يقلل ربط الانجذاب للمثبط. وذلك يهدد الأسس الجزيئية لمقاومة الممرض بواسطة طفرات GyrB بعد التعرض لمضادّات كيومارين الحيوية (ماكسويل Maxwell, 1997).

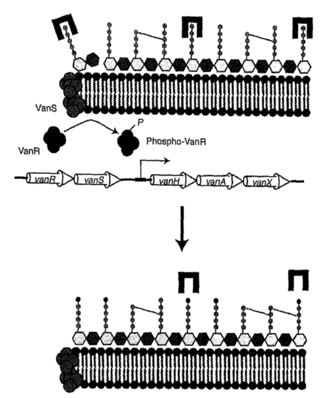
الحماية أثناء إنتاج المضاد الحيوي في المنتجين من عائلة الفانكوميسين

تُصنع المضادّات الحيوية من مجموعة الفانكوميسين بواسطة المتسلسلات (streptomycetes) وأكتينوبلانات (actinoplanes). ومجموعات الجينات لنظير الفانكوميسين، كلوروإيرومومسين (choroeromomycin) (فان واجينينجين وآخرون van Wageningen *et al.*, 1998) (الشكل ٧,٨)، ولهيكل البِبْتيد السباعي (heptapeptide) البديل للتيكوبلانين (سوسيو وآخرون Sosio *et al.*,) و A47934 (بوتولال وآخرون Pootoolal *et al.*, 2002)، ولقد تم تحديد تسلسل الجزء غير المرتبط بالغليكوسيل (nonglycosylated version) من التيكوبلانين من المتسلسلة تويوكانسيس (*Streptomyces toyocaensis*). وسيتم تغطية منطق تفاصيل البناء الحيوي في الفصل الثالث عشر وآليات المقاومة المكتسبة في VRE في الفصل العاشر، حيث سنلاحظ أن أنماط VRE الظاهرة تنشأ من إعادة برمجة الإنزيمات التي تصنع المحطة النهائية D-Ala-D-Ala لطليعة الببتيدوغليكان خماسي البِبْتيد إلى المحطة النهائية D-Ala-D-lactate. وذلك سيقلل الانجذاب للفانكوميسين بنحو ١٠٠٠ – طية (بوق وآخرون Bugg *et al.*, 1991) وينشئ المناعة الذاتية.

وهذا الانتقال من الببْتيد الثنائي إلى ديبسيببْتيد (dipeptide to depsipeptide) يجريه ثلاثة إنزيمات مشفرة بواسطة vanH, vanA, vanX (انظر والش وآخرون Walsh et al.,1996 b). وتوجد مكافئات VanH, VanA, VanX في ترادف (tandem) كل من *S.toyocaensis* منتجي A47934 (مارشال وآخرون Marshall *et al.*, 1998) وفي منتجي التيكوبلانين، بالقرب من مجموعة البناء الحيوي للتيكوبلانين (سوسيو وآخرون Sosio *et al.*, 2000). كما تم فحص فسيولوجيا *S.toyocaensis*. والمزارع هي حساسة لـ A47934 أثناء النمو اللوغاريتمي (logarithmic growth) عندما لم يتم تصنيع المضاد الحيوي بعد. وعند تلك المرحلة من دورة الحياة، تنتج سلاسل الببتيدوغليكان D-Ala-D-Ala بواسطة D-Ala-D-Ala لبجيز (الإنزيم الرابط) (ligase ليغاز) الطبيعي. وعندما يدخل الكائن مرحلة الاستقرار (stationary phase) ويشغل الجينات لإنتاج المضاد الحيوي فإنه كذلك يُشغِّل vanH,vanA,vanX لصنع D-Ala-D-lactate، بواسطة بروتين A، المعروف بـ ddlM في هذا الكائن (مارشال وآخرون Marshall *et al.*, 1997)، ليعيد برمجة طبقة الببتيدوغليكان إلى عدم الحساسية للمضاد الحيوي الذي تم صنعه الآن (الشكل ٧,٩). وهكذا فالتبديل يحدث بطريقة منسقة ومؤقتة.



الشكل (٧,٨). مضادّات الغليكوببتيد الحيوية.



الشكل (٧,٩). تنظيم جينات vanH,vanA, vanX يساعد إعادة تركيب جدار الخلية إلى عدم الحساسية لمضادّات الغليكوببتيد الحيوية عند البناء الحيوي للمضاد الحيوي.

إستراتيجية الحماية في منتجي ميتوميسين (mitomycin)

تنتج المتسلسلة لافينديولي *(Streptomyces lavendulae)* ميتوميسين المحتوي على كوينون سي (quinone C) والذي يعد مضاداً حيوياً مضاد للأورام بخاصية الربط – عبر التساهمي لـ دنا عند التسلسلات CpG (CpG sequences) في كلا خيطي دنا بعد الاختزال الحيوي (bioreduction) (الشكل ٨٧,١٠) لجزء بنزوكوينون (benzoquinone) للدواء بواسطة الإلكترونات ربما من السلسلة التنفسية للبكتيريا. تحتوي المتسلسلات المنتجة على جين المقاومة mcrA الذي يرمز فلافوبروتين (flavoprotein) مع العنصر المساعد فلافين أدينين داينيوكليوتيد (flavin adenine dinucleotide cofactor) الذي يساهم في الحماية المتواسطة بالأكسدة (redox-mediated protection). والميتوميسين هو دواء موالي (prodrug) في شكله المؤكسد عند إكمال بنائه الحيوي . ويجب أن يخضع إلى اختزال (reduction) الإلكترونات ومن ثم يستطيع أن يعيد ترتيبه بواسطة فقد الميثانول كوينون ميثيد (quinone methide) والذي بإمكانه الاستيلاء على الـ دنا. ويقترح أن الإنزيم المساعد لفلافين أدينين داينيوكليوتيد النشط – بأكسدة بروتين المناعة McrA يعيد أكسدة الشكل المختزل للميتوميسين في المنافسة مع ، وبذلك يعرقل إعادة الترتيب ليكشف مجموعة دنا – الوظيفية النشطة (الشكل B٧,١٠).

وهذا يعتبر المثال الأول الذي تم الإعلان عنه لآلية الحماية - الذاتية المتواسطة — بالأكسدة في منتجي المضاد الحيوي (شيلدون وآخرون Sheldon *et al.*, 1997) ويشدد على التنوع الكيميائي الحيوي المدهش الذي سوف يستعمله منتجي المضادّات الحيوية لتوفير مناعة - ذاتية لأسلحتها الكيميائية.

الشكل (٧,١٠). ميتوميسين: (A) الربط التبادلي لــ دنا بواسطة الإختزال الحيوي المقلون (bioreductive alkylation)، (B) إعادة الأكسدة الإنزيمية لميتوميسين الثنائي المائي (dihydro mitomycin) بواسطة McrA للحمايو - الذاتية.

المقاومة الطبيعية والمكتسبة في البكتيريا المُمْرضة

الأمثلة في الفصول الأربعة السابقة تجسد النواع لآليات المقاومة المكتسبة التي من المفترض أن تكون قد تراكمت، بعضها من المصدر لهذه الجينات في الكائنات المنتجة والأخرى تطوّرت من التدبير المحلي للإنزيمات إلى مواصفات جديدة، بواسطة بكتيريا التربة التي قد تطوّرت بالمشاركة مع جيرانها منتجي المضادّات الحيوية في مئات الملايين من السنين.

للمجينات (genomes) الكاملة لمُمْرضتين من المُمْرضات البكتيرية الهامة للإنسان، الزائفة الزنجارية والمكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA) كُشف عن وجود إستراتيجيات مختلفة (كرودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001، ستوفر وآخرون Stover *et al.*, 2000) للحماية - الذاتية.

إن سلالات الزائفة الزنجارية يمكن أن تكون المتهمة الأساسية في تجرثمات الدم المهددة – للحياة في مرضى الحروق، والعوامل المسبِّبة لعداوى الجهاز البولي في المرضى بالقساطر البولية، والعوامل المسبِّبة للالتهابات الرئوية في المرضى على المتنفسات وعداوى الرئة المزمنة في المرضى المصابين بالتليف الكيسي (cystic fibrosis). ولكن هذه الزائفات (pseudomonads) عموماً أقل فوعية (ضراوة virulent) بكثير من المكورة العنقودية الذهبية وعادة ما تسمى مُمْرِضات إنتهازية (opportunistic pathogens)؛ بسبب أنها تنشئ العداوى الخطيرة بشكل كبير في المضيفين منقوصي المناعة. توجد سميتان في التحليل الأول لملاحظة مسبب إطار القراءة المفتوحة للزائفة الزنجارية PA01'5,570 (ستوفر وآخرون Stover *et al.*, 2000). الأولى كانت في عدد أكبر من اثنين – من مكونات الجهاز التنظيمي –٥٥ إستشعار كينيزيز –٥٥ (55- sensor kinases)، ٨٩ الاستجابة المنظمة لعوامل الانتساخ (response regulator transcription factors)، و١٤ استشعار/استجابة منظم البروتينات المندمجة (14 sensor/response regulator fusion proteins) ليسمح بالمرونة في الاستجابة للمدخلات البيئية والتكامل فيما بين عديد من المدخلات خارج الخلية التي قد تجعل الزائفة الزنجارية مُمرِض ناجح (رودريجو وآخرون Rodrigue *et al.*, 2000). الثانية كانت العدد الكبير من مسامات الغشاء الخارجي: ١٩ أعضاء من عائلة OprD، ٣٤ جين من عائلة TonB، و١٨ في عائلة جين OprM. تعد الزائفات مقاومة داخلياً للعديد أو معظم المضادّات الحيوية؛ بسبب أنها تحتفظ بتركيز منخفض صافي داخل الخلية. وسعة المسام هي مؤشر واحد، والمرتبطة منها هي مضخات التدفق (تم شرحها بالتفصيل في الفصل التاسع)، مع ١٠ من العائلة الفرعية Mex و٢٠ من العائلة الفرعية Bmr. وهذه المضخات تستطيع أن توفر الحماية ضد المُركَبات الغريبة، ولتضمن بأن معدل النفاذ / التدفق (efflux / influx ratio) هي الآن على جانب النفاذ (التدفق للخارج).

تعدُّ السلالات العالية الفوعية من المكورة العنقودية الذهبية MRSA و VRSA (المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوميسين) مُمْرِضات أكثر فوعية للإنسان في المرض وقد سُميت مُمْرِضات محترفة بعكس الانتهازية التي نُوه عنها في الفقرة السابقة. وكشفت المجينات لسلالة N315 MRSA وسلالة Mu50 VRSA (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) ٣ أو ٤ مجموعة جينات في جزر الإمراضية (pathogenicity islands) و٢٦ إلى ٢٨ مجموعة جينات على العناصر الجينية المتحركة. وكلا النوعين من المجموعات يعكس الآليات حول كيف تلتقط المكورة العنقودية الذهبية الجينات من مكان آخر وتقدمها لتوظف على الفوعية والإمراضية. جميع الينقولات (الترنسبوزونات) وتسلسلات الغرس المصرح بها تصنع إلى نحو ٧٪ من مجينات المكورة العنقودية الذهبية هذه، في أنها تكاد تكون غير موجودة من بكتيريا أخرى موجبة – لغرام، العصية الرقيقة *(Bacillus subtilis)*. وهناك ما يقرب من ٧٠ إطار قراءة جديد مفتوح متورط في الفوعية تم العثور عليه بواسطة كورودا وآخرون2001 (Kuroda *et al.*, 2001). ومن حيث التقاط الجين المحدد الذي يؤدي إلى مقاومة المضاد الحيوي، الجدول (٧،٢) (استناداً إلى بيانات كورودا وآخرون2001 (Kuroda *et al.*, 2001)، لوحظ ٩ جينات التي تمنح المقاومة للمضاد الحيوي في سلالات MRSA وVRSA، وتشمل كل من *blaZ* و *mecA*

لمقاومة البيتا - لكتام (الفصلان الثامن والعاشر)، *ermA* لمقاومة الإريثروميسين (الفصل العاشر)، *ant4',ant9'*، و*aaA-aphD* لتعديل الامينوغليكوسيد (الفصل الثامن)، و *tetM* و*qacA* لمضخات تدفق الدواء (الفصل التاسع). تحتوي الجزيرة الإمراضية التي تسمى SSC_{mec} على الجينات *bleO, blaZ, mecA, ermA* و *ant4'* ومن الواضح أنها المحددات الجينية التي تساهم في براعة سلالات MRSA كمُمْرِضات محترفة (هيرماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001).

الجدول (٧,٢). جينات المقاومة للمضاد الحيوي الموجودة في MRSA.

البروتين	الجين	مقاومة المضاد الحيوي
البروتين المقاوم للبليوميسين	bleO	بليوميسين
PBP2'	*mecA*	*بيتا*-لكتاميز
بيتا - لكتاماز	*blaZ*	*بيتا*-لكتامز
rRNA ميثيلاز	*ermA*	إريثرزميسين، بريستيناميسينات
أو- نيوكليوتيديل ترانسفيراز	*ant 4', ant 9'*	أمينوغليكوسيدات
أسيتيليز- فوسفوترانسفيراز	*AacA-aphD*	أمينوغليكوسيدات
TetM بروتين التدفق	*tetM*	تتراسيكلينات
QacA	*qacA*	المطهرات

ولقد تم اختبار حساسية البكتيريا للأدوية المضادة البكتيرية كلاسيكياً بواسطة المقايسات الظاهرية التي تقيم قابلية المضاد الحيوي لتثبيط نمو البكتيريا تحت ظروف نمو معينة. وبالإمكان استخدام صيغ مختلفة، تشمل مقايسات انتشار القرص (disk diffusion)، وتخفيف الإيغار (agar dilution)، وتخفيف المرق (broth dilution).

وعلى سبيل المثال، فالأقراص المشبعة بمادة الكيفالوسبورين غير الملونة، نيتروسيفيم (nitrocefem) يمكن استخدامها لاختبار البكتيريا التي تنتج بيتا - لكتاميز. ويؤدي فتح الحلقة في حلقة لاكتام للنيتروسيفيم إلى التخلص من مادة نيتروالعطرية (nitroaromatic) الغنية بالإلكترون المستبدلة الصفراء، وهكذا ينتج عن الاختبار تَطوُّر اللون. وفي الآونة الأخيرة، أصبحت الطرق التي تقيم النمط الجيني للمقاومة للمضاد الحيوي مباشرة بدلاً من النمط الظاهري للحساسية أكثر استعمالاً (تمت المراجعة بواسطة كوكوريل Cockerill, 1999) وبالأخص عندما تكون الطفرات السائدة المُسبِّبة للمقاومة معروفة وبالإمكان بسهولة فحصها وراثياً. وعلى سبيل المثال، بالإمكان الكشف بسهولة عن وجود جين *mecA* في العزل المكوراتي العنقودي السريري بواسطة PCR (تفاعل ساسلة حافز البلمرة) لمنطقة من *mecA*، يتبعها تحليل الرحلان_الكهربائي للهلام (gel electrophoresis). كما أنه بالإمكان الكشف بسهولة عن وجود جين *mecA* على الهلام المصبوغ بواسطة بروميد الإثيديم (ethidium bromide) (كوكريل Cockerill, 1999). وبشكل مناظر، فإن

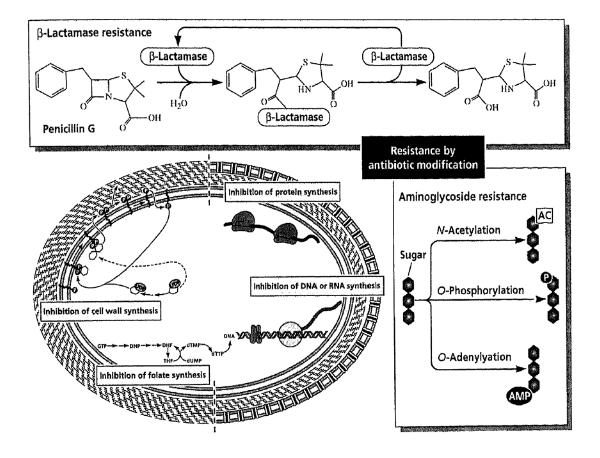
اكتساب الجينات من عائلة TEM- بيتالاكتاماز (TEM β-lactamase family) الذي يحدث مقاومة سريرية للسيفتازيديم، سيفوتاكسيم وأزتريونام (انظر الفصلان الثالث والثامن) في عزل الكلبسيلة الرئوية (Klebsiella pneumoniae) والإشريكية القولونية، يمكن بسهولة الكشف عنه بواسطة تحليل PCR وتقييد جزء من طول متعدد الأشكال (restriction fragment length polymorphism) (كوكريل Cockerill, 1999). ولقد تم الكشف عن مقاومة الريفامبين في المتفطرة السلية بواسطة تحليل PCR للطفرات في جين *rpoB* الذي يرمز للوحدة الفرعية بيتا لحافز بلمرة رنا بينما مقاومة الكوينولون يتم الكشف عنها بواسطة تحليل PCR وتعاقب تسلسل دنا لأجزاء من جين *gyrA* الذي يرمز الوحدة الفرعية *GyrA* لإنزيم دنا غايراز، والمسئول بفعاليّة عن جميع المقاومة السريرية للكوينولون (كوكريل Cockerill, 1999).

والخلاصة، أن الطرق الثلاثة للحماية الذاتية في منتجي مضادّات الميكروليد الحيوية التي لوحظت في الشكل (٧,١١)، مهدت لمرحلة لفهم الإستراتيجيات الثلاث الرئيسة لمقاومة البكتيريا للمضادّات الحيوية التي سوف نكشف عنها في الفصلان الثامن والعاشر. الأولى ممثلة بالتعطيل المؤقت للشكل داخل الخلية للمضاد الحيوي في منتجي أولياندوميسين. والمشابهة في المُمْرضات المقاومة بالإمكان وصفها بالتدمير الإنزيمي للمضاد الحيوي، كما هو الحال في الإنحلال المائي للبيتا لكتام، تحوير (تبديل) الامينوغليكوسيد، وأسر الفوسفوميسين (fosfomycin capture) بواسطة جلوتاثيون (glutathione) (الفصل الثامن). إن تدفق المضادّات الحيوية الداخل الخلوية الممارسة بواسطة المنتجين، والموضحة بفعل مضخة OleB هو نذير لإستراتيجية عامة لخفض التركيز المحيط للمضادّات الحيوية داخل خلايا المُمْرضات.

طريقة الحماية – الذاتية للمنتج	تعطيل النشاط المؤقت للمضاد الحيوي داخل الخلية	تدفق المضاد الحيوي المنتج	تعديل الهدف في المنتج
مثال على الحماية – الذاتية لمنتج الميكروليد	تسكير الأوليباندوميسين	تصدير الأوليباندوميسين بواسطة OleB	نزع الميثيل من الإدينين في 23S rRNA
N, N, N, rRNA	OleB	OH, R2, O, OH, HO, N	23S rRNA:m$_2$A2085
الطريق المشابهة للمقاومة البكتيرية السريرية الملاحظة	تعطيل نشاط المضاد الحيوي	تدفق المضاد الحيوي	تعديل الهدف

الشكل (٧,١١). التشابه بين الحماية – الذاتية للمنتجين والمقاومة البكتيرية.

وهذا يمكن أن يكون مزيج من معدلات تدفق منخفضة تعمل غالباً في البكتيريا السالبة – لغرام من خلال نفوذية حاجز الغشاء الخارجي، بالإضافة إلى معدلات التدفق المتسارعة. وبإمكان بروتينات مضخة التدفق أن يكون لها ألفة (نوعية) ضيقة (narrow specificity)، مثال، بروتين TetB للتراسيكلين، أو أن يكون لها انتقائية واسعة، كما هو الحال مع بروتينات مضخة التدفق متعدِّدة الدواء (الفصل التاسع). والآلية الثالثة هي أن المُمْرض يغير البروتين الهدف بحيث أنه يظل يحتفظ بوظيفته الفسيولوجية ولكن الآن له انجذاب أقل للربط مع المضاد الحيوي (الفصل العاشر). وفي بعض منتجي الإريثروميسين، ما تزال هذه الإستراتيجية معمول بها بواسطة المثيلة الثنائية *N,N*-dimethylation A_{2058} في 23rRNA لتصنع وحدة 50S الفرعية المقاومة. وتحوير (تبديل) الهدف في المُمْرضين يمكن أن يكون طفرات في أو استبدال البروتين – البري (wild- type protein)، كما هو الحال في البروتينات المرتبطة – بالبنسيلّين، أو تبديل في الركيزة (المادة) للإنزيم الرئيسي، كما في إعادة برمجة D-Ala-D-Ala-D-lactate.



تعديل المضادّات الحيوية بواسطة البكتيريا المقاومة

الفصل الثامن

التدمير الإنزيمي أو تعديل المضاد الحيوي بواسطة البكتيريا المقاومة

ENZYMATIC DESTRUCTION OR MODIFICATION OF THE ANTIBIOTIC BY RESISTANT BACTERIA

هذا الفصل هو الأول من ثلاثة (الفصلان الثامن والعاشر) التي تتعامل مع الآليات الثلاثة الرئيسة لمقاومة المضادّات الحيوية. الشكل في افتتاح الفصل يبرز قسم من الشكل (٢،٢) الذي يلخص المقاومة بواسطة تعديل (تغيير) المضادّات الحيوية.

يحدث تعطيل النشاط الإنزيمي للمضادّات الحيوية مع العديد من المنتجات الطبيعية من أصناف المضادّات الحيوية ولكن لم يلاحظ بعد كطريقة لتَطوُّر المقاومة لأصناف المضادّات البكتيرية الاصطناعية: كتوليفة سلفاميثوكسازول، الفلوروكوينولونات، أو أوكسازوليدينونات. وهذا قد يعكس زمن تعرض البكتيريا للمنتجات الطبيعية، افتراضاً مئات الملايين من السنين، مقابل ٧٠ عاماً أو أقل لصنع الإنسان المضادّات الحيوية. وهذا المعيار قد يوحي أن المضادّات الحيوية الجديدة المصنوعة من مكتبات الكيميائيات الاصطناعية التي لا توجد في الطبيعة يمكن أيضاً أن يعطل نشاطها ببطء بواسطة هذه الآلية. وبالطبع، فطرق تعطيل النشاط الأخريين، التي تم شرحها في الفصلان التاسع والعاشر، يمكن أن تكون فعّالة.

الطريقة الأكثر انتشاراً لتَطوُّر المقاومة السريرية لمضادّات بيتا-لكتام الحيوية هي استخراج إنزيمات البيتالاكتاماز (*β-lactamases*) التي تحلل (تذوب) المضاد الحيوي (بوش وموباشري Bush and Mubashery, 1998). وقد اقترح أن الخسائر الاقتصادية السنوية تقدر بحوالي ٣٠ بليون دولار في سكان الولايات المتحدة من الأمراض التي تسببها البكتيريا المقاومة المنتجة للكتاميز (بالومبي Palumbi, 2001).

تدمير مضادّات بيتا- لكتام الحيوية بواسطة بيتا- لكتامازات

العائلات الفرعية من البيتا لكتامازات: الإنزيمات المُذوبة للموقع -النشط سيرين

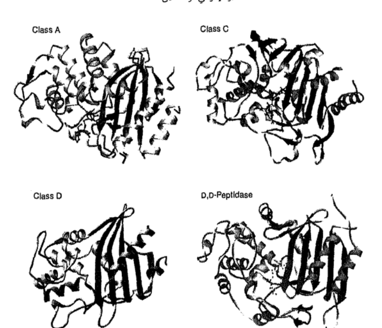
(Subfamilies of *β*-lactamases: active –site serine hydrolases)

تحلل إنزيمات البيتالكتاماز حلقة البيتالاكتام ذات الأربعة - أطراف في كل من أصناف مضادّات البنسيلّين والكيفالوسبورين الحيوية فضلاً عن مجموعة الكاربابينيم (الشكل ٨،١). وهم بذلك يدمرون النشاط المضاد للبكتيريا

بواسطة تعطيل نشاط الرؤوس الحربية الكيميائية في الجزئ، البيتالاكتام المتوتر الذي يعدُّ المجموعة الكيميائية المؤسلة (acylating group) النشطة لتعديل موقع سيرين – النشط من السلاسل الجانبية في البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين (PBPs) (ترانسببتيدازات وكربوكسيببْتيدازات (transpeptidases and carboxypeptidases) في الربط التبادلي للببتيدوغليكانات، انظر الفصل الثالث). ولقد اكتشف نشاط البيتالاكتاماز قبل سنوات قليلة من الاستعمال السريري للبنسلين في الإنسان، مما يدل على وجود البكتيريا في التربة التي تكافح البنسيلّين المنتج الطبيعي والآن أكثر من ١٩٠ بيتالاكتاماز تم وصفها (بوش وموباشري ١٩٩٨، ثومسون ومولاند Thomson and Moland, 2000) وتصنيفها إلى الصنف A,B,C,D بيتاكتامازات (بوش وموباشري Bush and Mobashery, 1998). والأصناف A,C,D هي إنزيمات ذات الموقع – النشط سيرين، مع التشابه المعماري والآلي للبروتينات المرتبطة بالبنسيلّين (PBPs) (نوكس Knox, 1995، نوكس وآخرون Knox *et al.*, 1996)، (الشكل ٨,٢) مما يوحي على التَطوُّر من البروتينات المرتبطة بالبنيسيلين.

يتكون في أصناف A,C,D من البيتالاكتاماز نفس نوع إنزيم بنسيلويل – أو سير (pencilloyl-*O*-Ser) المتواسط التساهمي كما هو الحال في الدورة المحفزة للبروتينات المرتبطة بالبنسيلّين التي تهاجم وتفتح حلقة البيتالاكتام وتصبح مؤسلة – ذاتياً (الفصل الثالث). ولا يوجد إنزيم بنسيلويل متواسط تساهمي في الدورة الحفَّازة لصنف B بيتالاكتامازات (الشكل ٨,٣) المعتمد على الزنك، والذي له عواقب لفشل صنف B بيتالاكتامازات من أن تُثبط بواسطة الأدوية المعينة، كما تم شرحه لاحقاً.

الشكل (٨,١). فتح الحلقة المُدوبة وتعطيل نشاط (A) البنسيلّينات، (B) الكيفالوسبورينات، و(C) الكاربابينيمات بواسطة بيتالاكتامازات.



الشكل (٨,٢). تراكيب الأصناف A,B,C,D من البيتالاكتاماز والتناظر إلى طية D-D-peptidases (PBP). (الشكل المقدم بالإذن من جي. نوكس J.Knox).

Serine β-Lactamase → H_2O →

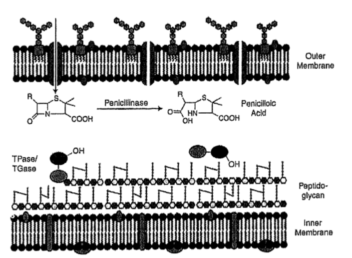
Zinc β-Lactamase →

الشكل (٨,٣). تحلل حلقة البيتالاكتام للبنسيلّين بواسطة أصناف A,C,D بيتاكتاميز التي تشمل إنزيمات بنسيلويل التساهمية المتواسطة، بينما أصناف بيتالاكتاماز B المعتمدة على الزنك تنفذ عملية الهجوم بواسطة الماء.

وقد كان هناك جدل على أن البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين قد تكون نشأت إلى بيتالاكتامازات عدة مرات وبشكل مستقل، من أجل توليد مختلف الاتجاهات لرواسب الموقع- النشط في الصنف A,C,D من البيتالاكتامازات (انظر ماسوفا وموباشري Massova and Mobashery, 1998، والمراجع الواردة فيه). والفارق في النتيجة وانقلاب البيتالاكتامازات والانتحار من أجل ترانسببتيدازات للبروتين المرتبط بالبنسيلّين (PBP transpeptidases)، ينشأ من الأعمار المختلفة لإنزيمات أسيل – أو سير (acyle –*O*-Ser). وفي إنزيم بنسيلويل -PBP- أسيل من الترانسببتيدازات،

يستبعد الماء من الموقع النشط ويكون التحلل بطيء للغاية (يبلغ زمن – النصف لنزع الأسيل حوالي ٩٠ دقيقة، مقارنة بأربع دقائق لإنزيم N-acyle-D-Ala-D-Ala acyle من المادة الطبيعية) (فيشر وآخرون Fisher *et al.*, 1980)، وبشكل مماثل فالعمر الزمني لإنزيم بنسيلويل يكون طويلاً، ويعطل نشاط الترانسببتيداز، ويتوقف الربط التبادلي للببتيدوغليكان (للمراجعة، انظر نوكس وآخرون Knox *et al.*, 1996). وعلى النقيض، يشمل نشاط اللاكتاميز التحلل المائي، وليس أسر إنزيم أسيل– أو – سير بواسطة الأمين (amine)، وللماء حرية الوصول للموقع –النشط لإنزيم بنسيلويل– أو – سير، ومعدل نزع الأسيل يكون سريعا (الشكل ٨,٤)، s^{-1} 2.600 للبيتالاكتاماز TEM-1. ويبلغ صافي الفرق في معدل نزع الأسيل لنفس الإنزيم المتواسط بنسيلويل– أو – سير في اللاكتاميز مقابل PBP 2.7×10^7. تفرز البكتيريا السالبة – لغرام المنتجة للبيتاكتاميز هذا الإنزيم المشرف إلى داخل فضاء الجبلة (periplasmic space) بحيث أن مضادّات البيتالاكتام الحيوية تتحدى هذه الإنزيمات المحللة لتصل إلى أهدافها عند سطح الغشاء السيتوبلازمي (الشكل ٨,٥)، مما يجعل من الصعب على أي بيتالاكتام سليم الوصول إلى هدفه PBP.

الشكل (٨,٤). نصف – الأعمار المختلفة لأنزيم أسيل – أو– سير المتواسط التي تتحكم بالنتائج بواسطة بنسيلويل–PBPs مقابل بنسيلويل– بيتالاكتامازات.



الشكل (٨,٥). بيتالاكتامازات في جبلة الخلية البكتيري يحلل البنسيلّينات والكيفالوسبورينات قبل أن يصل لهدفه PBPs عند الوجه الخارجي للغشاء السيتوبلازمي. Tpase/ Tgase، ترانسببتيداز/ تراتنسغليكوزيلاز ثنائي الوظيفة.

يُرمِّز TEM-1 (داتا وكونتوميكالو Datta and Kontomichalou, 1965) وTEM-2 لكتامازات ذوي العلاقة المنتشرين في البكتيريا – السالبة – لغرام مثل الإشريكية القولونية والكلبسيلة الرئوية، على عناصر نقل وتتحرك بسرعة خلال جمهرة البكتيريا (أميز Amyes, 2001، ويديمان وآخرون Wiedemann *et al.*, 1989). وكان الكيفالوسبورينات – ممتد – المدى مثل سيفتازيديم وسيفوتاكسيم (التراكيب في الشكل ٨,٦، انظر كذلك الفصل الثالث) قد طُوِّر للتغلب على المقاومة المقدمة بواسطة TEM-1 والبتاكتامازات ذات العلاقة. وفي المقابل، فإن ما لحق من الاستخدام الواسع الانتشار للكيفالوسبورين، يعتقد أنه قد انتقي للطفرات المتعاقبة في TEM بيتالاكتامازات، منتجاً إنزيمات حالّة والتي حسنت الانجذاب لأطر اللاكتام هذه وما يعقب ذلك من المقاومة الممتدة – للبيتالكتام (انظر الفصل السابع عشر). والعديد من TEM لكتامازات المتغيرة قد تم عزلها وتسلسلها (مثال، جوسارد وكورفالين Goussard and Courvalin, 1999). وبخصوص التقدم الذي أحرز عن تحديد تراكيب أشعة – إكس للكتامات ووسائط إنزيم أسيل المشتق من اللاكتام في الموقع النشط للكتامازات، انظر بيدل وآخرون Beadle *et al.*,2002.

بيتالاكتاماز– المعدن (المفلز): الإنزيم الحال– للزنك

(Metallo-β-lactamases: zinc hydrolases)

صنف B بيتالاكتاماز هي إنزيمات الزنك، وتحتوي على مجموعة زنك ثنائية النواة في الموقع النشط (توني وآخرون Toney *et al.*, 1998، وانج وآخرون Wang *et al.*, 1999). وعلى عكس الأصناف A,C,D بيتالاكتاماز، التي تفتح حلقة اللاكتام عن طريق وسائط إنزيم أسيل التساهمي، التي نوه عنها أعلاه، يستعمل صنف B بيتالاكتاماز الزنك لتنشيط جزيء الماء ويحفز إضافته المباشرة إلى حلقة البيتالاكتام (الشكل ٨,٣). ويعتقد أن النوع B من البيتالاكتاماز – المعدن هو الصنف الفرعي الرئيس للإنزيمات الحالّة (hydrolases) التي تدمر مضادّات كاربابينيم الحيوية مثل إميبينيم (ثيناميسين thienamycin) وميروبينيم (الشكل ٨,٦). والاستعمال الواسع للكاربابينيم في اليابان (كروكاوا وآخرون Kurokawa *et al.*, 1999) ربما كان مساعداً في انتقاء نسخة IMP-1 من بيتالاكتاماز – الزنك التي شوهدت للمرة الأولى في سيريشيا (المنشارية) مارسيسنز *(Serratia marcescens)* والزائفة الزنجارية. ولقد تم وصف إنزيمات الكاربابينيمازات (carbapenemases) كمشكلة سريرية في الانتظار لعداوى الزئفة (ليفرمور وودفورد Livermore and Woodford, 2000) ولكن كانت مشكلات مقاومة الكاربابينيم الأكثر حدة في الزائفة الزنجارية هي في آليات التدفق، كما لوحظ في الفصل التاسع. والعديد من البكتيريا التي تنتج النوع D من الإنزيم الحال المفلز (type D metallohydrolases) تنتج كذلك الأنواع A,C أو D لكتاميز (راسموسين وبوش Rasmussen and Bush, 1997)، وعلى سبيل المثال يحمل العزل السريري من *S.marcescens* النوع A وانوع B من الجين *bla* على البلازميد (يانو وآخرون Yano *et al.*, 1999).

الشكل (٨,٦). التعديلات التركيبية في سلاسل أسيل الجانبية لمضادّات البيتالاكتام الحيوية من أجل البناء في المعالجة البطيئة بواسطة بيتالاكتاماز. يظهر تحليل أشعة – إكس لمضادّات البيتالاكتام الحيوية الممتدة المدى بواسطة بلورات بيتاكتاميز المشتركة أن السلسلة الجانبية الضخمة توفر عرقلة شديدة الفراغية لتحديد الموقع المناسب للماء في خطوة نزع الأسيل ومسئولة عن k_{cat} s التحلل الإنزيمي المائي.

الإستراتيجيات لمعادلة بيتالاكتاماز

هناك طريقتان قد تم الأخذ بهما في العقود منذ بدأ العزل السريري المقاوم – للكتام ينقص فعاليّة البنسيلّينات والكيفالوسبورينات كمضادّات حيوية. الأولى كانت لتطوير بيتالاكتام شبه اصطناعي والتي كانت مواد أبطأ للهجوم بواسطة اللاكتامازات الحالّة بالماء (hydrolytic lactamases). والطريقة الثانية كانت للكشف عن مثبطات ومعطلات نشاط لفعاليّة اللاكتاماز ومن ثم تجمع هذه الجزيئات مع البيتالاكتام. وكل من الطريقتين لها نجاحاتها (نوليس Knowles,1985).

المواد (الركائز) البطيئة للبيتاكتامازات

البحث عن لاكتامز شبه اصطناعي الذي يحتفظ بقوة المضاد الحيوي ولكن له فعاليّة متزايدة ضد منتجي الاكتاميز أبرز عديداً من الجزيئات التي أدخلته في المعالجات السريرية. وأساساً هذه إستراتيجية لإيجاد بدائل على رؤوس حرب بيتاكتام الكيميائية التي تعرقل ربط بيتالاكتاماز و/ أو التحفيز ولكن لا تتدخل مع ربط PBP وعملية الأَسَلة (acylation). وتقع المونوبكتامات وحيدة الحلقة (monocyclic monobactams) ضمن هذه الفئة، وأزتريونام (aztreonam) هو أحد الأمثلة (الشكل ٨,٦). وكذلك في هذه الفئة الكاربابينيمات، ويستبدل الكبريت (sulfur) في الخمس حلقات بالكربون (الشكل ٨,٦)، وهذه هي الإستراتيجية في الميروبينيم (meropenem) والثيناميسين مركب الإميبينيم. بذل الكثير من الجهد لإيجاد الاكتامات التي لا تكون مواد للانحلال بواسطة الاكتامازات وركز هذا الجهد على كيفالوسبورين ٦/٤ ثنائي حلقة الإطار مع تغيير سلسلة أسيل الجانبية، منتجاً الأدوية مثل سيفتازيديم وسيفوتاكسيم

(الشكل ٨,٦) والتي تطيل مدى فعاليّة المضاد الحيوي لتعالج عديداً من المُمْرضات المنتجة – للبيتالاكتامازات (انظر كذلك الفصل الثالث). والمنطق كان أن سلاسل أسيل الجانبية الضخمة على مجموعة ٧–أمينو لإطار اللاكتام تسمح بتكوين وسائط أسيل-PBP (acyl-PBP intermediates) ولكنها تعرقل المعالجة بواسطة اللاكتامازات.

يعدُّ الكاربابينيم ثيناميسين مادة بطيئة لتحلل البيتالاكتامازات لأسباب مختلفة. يستطيع إنزيم الأسيل الوسيط (الشكل ٨,٧) أن يخضع لعملية تزامرية تشابكية مزدوجة – الربط (double –bond isomerization) في الحلقة ذات الخمس – أعضاء من Δ^2 إلى Δ^1 أوليفين (olefin)، إنيامين إلى إمين (an eneamine to an imine)، والشكل الأخير من إنزيم أسيل خو الأبطأ ليتحلل بحوالي ٥٠٠٠٠ – طية (انظر ماسوفا وموباشري Massova and Mobashery, 1998). وتعدُّ الكيمياء الفراغية (stereochemistry) لسلسلة هيدروكسي إيثيل (hydroxyethyl) الجانبية، 1R بدلاً من 1S في البنيسيلينات محدد مهم كذلك لعرقلة هجوم الماء في عملية نزع الأسيل (deacylation) من إنزيم الأسيل. والتحلل البطيء يعني العمر الطويل لإنزيم الأسيل، وبهذا فالقوة المحفزة المدمرة للبيتالاكتاماز بضخامة الأوامر في حين أنها وضعت في هذا التقريب التساهمي. وبديل– الثيناميسين، ميروبينيم (انظر ميتشر وآخرون1999 ,.Mitscher *et al*) (الشكل ٨,٦) له ميثيل مستبدل على الحلقة الخامسة لإتاحة الإعاقة الفراغية للربط إلى البتالكتامازات.

β-Lactamase

الشكل (٨,٧). التزامرية التشابكية في شكل إنزيم أسيل مفتوح – الحلقة من كاربابينيم ثيناميسين أثناء التدمير بواسطة بيتالاكتاماز يبطئ صافي التحلل المائي.

الآلية – المستندة على مثبطات الفعاليّة للبيتالاكتاماز

الطريقة الثانية، المسح للآلية – المستندة على مثبطات الفعاليّة للبيتالاكتامازات لتتبنى فلسفياً على النمط المشاهد مع الكاربابينيم – المشتق من إنزيم الأسيل. وهو يعتمد على إعادة ترتيب إنزيم أسيل -*O*- لكتاميز التساهمي (acyl-*O*-lactamase) الأولي إلى شكل الإنزيم التساهمي البديل الذي يعتبر أبطأ بكثير ليتحلل. ويوجد نوعان من الآلية المستندة على مثبطات الفعاليّة، أو مواد انتحارية، للبيتالاكتامازات لتصبح ناجحة سريرياً (ميتي وآخرون Maiti *et al*., 1998). الأول هو المنتج كلافولينيت (clavulanate) الطبيعي، وهو بيتالاكتام إينول إيثر (-enol ether *β* lactam) من المتسلسلة كلافوليجريس (*Streptomyces calvuligerus*)، والصنف الثاني يمثل بواسطة سلفون البنسيلّين

(penicillin sulfone) والبديل تازوبكتام (tazobactam) المتجانس (الشكل ٨،٨). وفي كل من الكلافولينيت وسلفون البنسيلّين، التعديلات التركيبية تضعف رابطة C-O أو رابطة C-S، بالترتيب، بحيث أن الهجوم بواسطة اللاكتاميز الموقع - النشط - سيرين OH- (lactamase active –site –serine –OH) على كربونيل البيتالاكتام يؤدي أيضاً إلى تجزئة ٥/٤ وصلة الحلقة، كما هو مبين في الشكل (٨،٩). والترتيبات اللاحقة تتبع ذلك، مع المزيد من التجزئة وتراكم إنزيم أسيل المعاد ترتيبه (ماسوفا ومباشري Massova and Mobashery, 1998). والتأثير الصافي للمعالجة بواسطة الصنف A للبيتالاكتاماز هو إنزيم أسيل مقترن ومهاجم أقل - بكثير بواسطة الماء لنزع الأسيل والتعطيل المقارن لإنزيم أسيل مفتوح - الحلقة اللاحق والمشتق من سلفونات البنسيلين. وأشكال إنزيم أسيل من البيتالاكتاماز الأكثر ثباتاً تعني أن هذا المضاد الحيوي - محفز التدمير قد وُظف في عقد طالما استمر بقاء إنزيم أسيل. ولا يعتبر الكلافونيت ولا حتى السلفونات أقوياء بما يكفي كمضادّات بيتالاكتام حيوية لتستعمل بمفردها ولذلك فهي تستعمل في تجميعات (تواليف) (الشكل ٨،٨). وعلى سبيل المثال، فتوليفة الأموكسيسيلين والكلافولينيت، المعروفة بالأجمنتين (Augmentin)، لزيادة القوى التي يضفيها الكلافولينيت إلى الأموكسيسيلين، كانت من أوسع أشكال البنسيلّين استعمالاً في السنوات الأخيرة. وفي مخطط الشكل (٨،٥)، يعطل الكلافولينيت نشاط ما يكفي من جزيئات البنسيلّينيز (penicillinase) (بيتالكتاماز) ليسمح للأموكسيسيلين بالبقاء في جبلة خلية منتجي البيتالاكتاماز ليعبر ذلك الفراغ سليماً. وهكذا بإمكان الأموكسيسيلين التحدي وبلوغ أهدافه PBP في الغشاء السيتوبلازمي (مثال، مجال الترانسببتيداز (TPase) لـ Tpase الثنائي الوظيفي/ PBP ترانسغليكوسيلاز ذا الوزن الجزئي - العالي). تعرف التوليفة المماثلة للسلبكتام (sulbactam) والأمبيسيلين بيوناسن (Unasyn)، ويباع تازوبكتام وبيبراسيلين كزوسن (Zosyn) (الشكل ٨،٨). بينما من الواضح أن هذه الآلية - المستندة على المثبطات سوف تستهدف فقط البيتالاكتاماز - المستند على السيرين وليس الصنف D اللكتامازات المعدنة (الشكل ٨،٣)، كما يلاحظ أن السلبكتامات والكلافولينيت هما الأكثر فعاليّة ضد الصنف A بيتالاكتاماز ونقص الفعاليّة المفيدة ضد الصنف C بيتالاكتاماز (برونسون وباريت Bronson and Barrett, 2001a)، وهكذا فهناك مجال للمزيد من تطوير الآلية - المستندة على مثبطات الكتاميز. لقد تم عزل البروتين المثبط للبيتالاكتامازبيتالاكتماز ((β-lactamase inhibitory protein (BLIP)) من المتسلسلة كلافوليجرس، التي تنتج الكلافولينيت، حيث من الممكن أن تكون بمثابة بروتين مناعة لحماية الكائنات المنتجة - للمضادّات الحيوية. BLIP له قيم K_i تبلغ مليون من مليون جزيء غرامي إلى جزء من ألف مليون جزيء غرامي ليرتبط مع العديد من بيتالاكتاماز (مثال، 0.1 to 0.6nM لـ TEM-1) (رودجريس وآخرون Rudgers *et al.*, 2001)، ولقد تم حل تركيب أشعة - إكس للمعقد BLIP وTEM-1 بيتالاكتاماز، المؤدي إلى نظرات ثاقبة إلى المثبطات- المستندة على البروتين ويقترح أن تحويل الببتيدات المشابهة إلى بيتا (β-turn peptidomimetics) سيجعلها مثبطات مفيدة (رودجريس وآخرون Rudgers *et al.*, 2001). والبروتين الثاني، BLIP-II، من المتسلسلة إكسوفوليتس (*Streptomyces*

(exfoliatus)، كذلك تم حل تركيبه في معقد مع TEM-1 بيتالاكتاماز، ليظهر طية متميزة من BLIP وطريقة أخرى لعرقلة الموقع النشط لـ TEM-1، كمثبط تنافسي لربط اللاكتام مع K_i 27pM القوي الاستثنائي (ليم وآخرون .Lim *et al*, 2001). ويبدو أن الوظيفة الفسيولوجية لـ BLIP هي في تبوُغ (sporulation) المتسلسلة، حيث إنها قد تثبط واحد أو أكثر من البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين في المتسلسلة لتعيد توجيه البناء الحيوي للببتيدوغليكان نحو تكوين الأبواغ.

Clavulanate   Sulbactam   Tazobactam

Clavulanate-Amoxicillin ⟶ Augmentin
Clavulanate-Ticarcillin ⟶ Timentin
Sulbactam-Ampicillin ⟶ Unasyn
Tazobactam-Piperacillin ⟶ Zocin

الشكل (٨,٨). الكلافولينيت، سلبكتام وتازوبكتام: الآلية – المستندة على مثبطات الفعاليّة للبيتاكتامازات.

الشكل (٨,٩). تحويل مسار وسيط إنزيم أسيل بواسطة الكلافولينيت وسلفون البسيلين لتثبيط فعاليّة البيتالاكتاماز.

مثبطات بيتالاكتاماز المعدن

أصبح استعمال الكاربابينيمات في معالجة كل من العداوى السالبة – لغرام والموجبة – لغرام ضعيفاً بواسطة التحلل المائي الإنزيمي وتعطيل الفعاليّة. بينما الكاربابينيمات وكما ذكر أعلاه مقاومة إلى حد كبيرلصنف A بيتالاكتاماز المستندة – على سيرين الكروموسومي، فهي تتحلل مائياً وبسرعة بواسطة الصنف B بيتالاكتاماز –الزنك (راسموسين وبوش Rasmussen and Bush, 1997)، مثال ذلك، في سلالات العصوانية الهشة *(Bacteroides fragilis)* المعزولة من عداوى مرضى الجراحة. وقد تم وصف تركيب أشعة – إكس للبيتالاكتاماز – المعدن CcrA (CcrA metallo-β-lactamases)

(توني وآخرون Toney *et al.*, 1998) والتي تستخدم في التصميم — المستند على — تركيب مثبطات تترازول الفينيل الثنائي (biphenyl tetrazole) التي تنسق للموقع — النشط الزنك وبالتالي فهي محددة لهذا الصنف البتالكتاميز المعدن. ولقد لوحظ ٥٠ ٪ التركيز المثبط حوالي ٠,٤ ميكرومتر لمثبط تترازول الفينيل الثنائي الأكثر فعاليّة، وكان هذا قد تبلور بالمشاركة ليثبت الربط للموقع — النشط وتربيط الزنك بواسطة أحد نيتروجينات حلقة تترازول. وقد يكون ذلكَ واعداً لإضافة الجزيئات للكاربابينيمات، بنفس الطريقة التي أضيف بها كلافولينيت أو سلبكتام إلى بيتالاكتام للحصول على التوليفة التي تتغلب على المقاومة – المتواسطة بصنف B بيتالكتاماز. ولقد تم وصف سلسلة من المنتجات الطبيعية الحلقية الثلاثية ذات الفعاليات المتوسطة تجاه هذه المجموعة الفرعية من البتالكتام (بايني وآخرون Payne *et al.*, 2002).

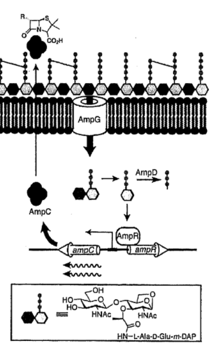
تنظيم إظهار جين بيتالاكتاماز و/ أو التحلل االذاتي في وجود البنسيلّين

بالإمكان طمر جينات بيتالاكتاماز في الريبوسومات البكتيرية، مثال جين *ampC* في البكتيريا المعوية أو جين *blaZ* في المكورة العنقودية الذهبية، أو بالإمكان حملها على نسخ متعدِّدة من البلازميدات أو الينقولات، كما هو الحال في جين TEM-1*bla* في مختلف البكتيريا السالبة – لغرام ذات المقاومة – العالية للبنسيلّين الموجودة في العزل السريري. وعادة فجينات *bla* لا يعبّر عنها بنيوياً (جوهرياً) ولكن تُشغل عندما تظهر مضادّات بيتالاكتام الحيوية في البيئة الدقيقة. وفي الآونة الأخيرة تمت تسوية نظم الإشارات (signaling systems) للكشف عن بيتالكتامز – الخارجية للإشريكية القولونية، المكورة العنقودية الذهبية والمكورة الرئوية وكشفت عن مسارات مختلفة لنقل الإشارة والتي يمكن أن تكون أهدافاً لعكس المقاومة المتواسطة – بالاكتاماز.

الإشريكية القولونية *E.coli*

في الإشريكية القولونية، تتحكم جينات *ampG,ampD,and ampR* في التعبير عن *ampC*– الذي يُرمِّز بيتالاكتاماز (جاكوبز وآخرون Jacobs *et al.*, 1997). ويُرمِّز جين *ampG* البروتين عبر – الغشاء الذي يعتقد أنه يعمل كإنزيم نفوذي (بيرمياز permease) الذي يورِد جزء من ببتيدوغليكان جدار الخلية الذي تم إطلاقه بواسطة تدمير الآلية الإنزيمية للربط المتبادل — عبر جدار الخلية عندما يبدأ البيتالاكتام أسَلة (acylate) البروتينات المرتبطة بالبنسيلّين ويمزق العملية المنظمة لإطالة الببتيدوغليكان وإعادة النمذجة (remodeling). والجزئي المنقول بواسطة AmpG هو ثنائي السكريل ثلاثي الببتيد (disaccharyl tripeptide) GlcNAc-anhydroMurNAc-L-Ala-D-γ-Glu-*meso*-DAP (الشكل ٨,١٠)، الذي تم إطلاقه بواسطة العمل المتتابع لثلاث إنزيمات. الأول هو عمل الإندوببتيداز (endopeptidase) ليفلق الروابط – التبادلية التي تمسك خيوط البِبْتيد سوياً. ومن ثم يأتي عمل الترانسغليكوزيلازات الحالة (lytic transglycosylases)، محفزة إضافة C_6-OH من مجموعة غليكوزيل في خيوط الجليكان إلى الموقع–١ (1-position)، ليفلق السكر بين الرابطة ويطلق ثنائي السكريد كإستيال نصفي داخلي (6,1-internal hemiacetal

(MurNAc) اللامائي (anhydroMurNAc). وتنشأ سلسلة البِبْتيد الثلاثي من تقصير البِبْتيد الرباعي أو سلسلة البِبْتيد الخماسي بواسطة فعل كربوكسيببتيداز- L,D (L-D-carboxypeptidase)، الإنزيم الثالث المطلوب لإنتاج جزء الإشارة. والآن الببتيد الثلاثي GlcNAc-anhydroMurNAc، الجزئي الصغير الذواب، يستطيع أن ينتشر للحقل الخارجي لـ AmpG، يرتبط، وينتقل إلى داخل السيتوبلازم (الشكل ٨,١٠)، حيث يستطيع أن يتفكك من AmpG. والآن بإمكان الببتيد الثلاثي ثنائي السكريد والذي تم إطلاقه إلى داخل السيتوبلازم أن يميز كربيطة (ligand) لـAmpR، عنصر الانتساخ ويحوله إلى الشكل النشط الذي يحرك انتساخ *ampC*، ثم يبدأ التعبير عن البيتالكتاميز. ويترجم AmpC بيتالاكتاماز مع تعاقب إشارة نهاية-N (N-terminal signal sequence) التي تستهدفها لنقلها إلى الغشاء السيتوبلازمي وتفرز إلى داخل الفراغ الجبلي، حيث تبدأ في تدمير مضاد البتالكتام بالتحلل المائي (مثال، كما في الشكل ٨,٥). ويوجد بروتين AmpD كذلك في السيتوبلازم، وهو إنزيم أميديز (amidas enzyme)، يفلق -GlcNAc anhydroMurNAc tripeptide. وهكذا فهو يسهم عند المستوى القاعدي إلى الدائرة المنظمة السالبة، ويجعل تركيز الببتيد الثلاثي ثنائي السكري منخفض وجين *ampC* بعيداً (جاكوبس وآخرون Jacobs *et al.*, 1997). وعندما يكون توريد إشارة الببتيد الثلاثي ثنائي السكريل عند مستويات عالية بسبب تفريق تجميع ببتيداالببتيدوغليكان المُحرِض — بالمضاد الحيوي، وافتراضياً فإن الكمية في السيتوبلازم تربك سعة AmpD وتفلت لترتبط مع AmpR.



الشكل (٨,١٠). مسار الإشارة للببتيد الثلاثي أنهيدروميوراميل (The anhydromuramyl tripeptide) لتحريض التعبير عن *ampC* في الإشريكية القولونية، الانتقال إلى السيتوبلازم بواسطة AmpG والترابط مع AmpR لتخليص الكبت الانتساخي لـــ *AmpC*، وإفراز AmpC إلى داخل الجبلة.

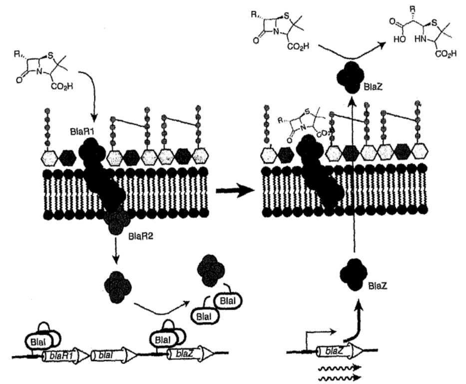
المكورة العنقودية الذهبية

لقد لوحظت في المكورة العنقودية الذهبية طريقتان للمقاومة السريرية ذات العلاقة. الأولى؛ بسبب إظهار بيتالاكتاماز BlaZ المرمَز بالكروموسوم، صنف A بيتالاكتاماز، الذي تم شرحه لاحقاً، والثاني هو الإظهار، في المكورة العنقودية المقاومة للمثسيلين (MRSA)، لـ PBP2A - غير حساس - للبنسيلّين جديد مرمَز بواسطة جين *mecA*، كما سيتم شرحه في الفصل العاشر. إن إظهار فعاليّة BlaZ بيتالاكتاماز محرض، والإظهار معطل في غياب البنسيلّينز والكيفالوسبورينات في البيئة الدقيقة وتَشغُل عند وصولهم إلى خارج الخلية. إن وظائف الاستشعار، التحول العبري (transduction) والتفعيل الانتساخي يتم توفيرها بواسطة اثنين من البروتينات المُرمَزة بواسطة جينات *blaR1* و*blaI* التي توجد فقط ضد تيار الجين *blaZ* (الشكل ٨,١١). وجميع الجينات الثلاث هي تنظم سلباً في حالة السكون بواسطة بروتين *BlaI*، وهو بروتين 14-kDa الذي يصبح ثنائي الجزء (dimerizes) ويرتبط مع مواقع محرضة (promoter regions) لكبح الانتساخ.

وعندما تصل مضادّات البيتالاكتام الحيوي إلى الوجه الخارجي للغشاء السيتوبلازمي حيث تطمر بضع نسخ من بروتين BlaR1 عبر البروتين، يكشف المضاد الحيوي وتحول الإشارة عبرياً. إن حقل إكسو (exo domain) لـ 66-kDa BlaR1 هو حقل PBP والإشارة الأولية تكون من خلال الأسلة التساهمية (covalent acylation) بواسطة البيتالاكتام، كما لأي حقل PBP (الشكل ٨,١١). إن تكوين وسيط إنزيم البنسيلويل التساهمي هذا في حقل إكسو (exo) هو مستشعر (ربما بواسطة تغيير التركيب في حقل PBP هذا) والإحتلال (الإشغال) المتحول خلال حقل عبر الغشاء وقرائته بواسطة حقل 30-kDa الداخلي لـ BlaR1 . يعدُّ الحقل الخارجي من نوع PBP– لـ BlaR هو الأكثر ذا العلاقة لصنف D بيتالاكتامازات (ماسوف ومباشري Massova and Mobashery, 1998)، ومتطابق مع نشوء (تَطوُّر) حقل الربط/ الاستشعار هذا من الصنف D بيتالاكتامازات (جويسين Ghuysen, 1991). وهذا من شأنه أن يكون عكس تَطوُّر PBPs إلى بيتالاكتامازات، واقترح في القسم السابق من هذا الفصل، مما يوحي بأن تَطوُّر البروتين قد ذهب في كلا الاتجاهين.

لدى حقل 30-kDa في داخل السيتوبلازم لـBlaR1 لديه علامات شكل طليعة إنزيم (proenzyme form) البروتييز - المعتمد على - الزنك (zin-dependent protease). وعندما يتشكل وسيط بنسيلويل — أو — سير (penicilloyl-*O*-Ser) على الحقل خارج السيتوبلازم، الحقل 30-kDa في الداخل يخضع إلى انفلاق ذاتي بين فضالة (بقايا) ٢٩٣ و٢٩٤ لتحرير الجزء السيتوبلازمي BlaR 30kDa. توجد سوابق الانفلاق الذاتي لأشكال طليعة إنزيمات بروتييز الزنك وربما تكون متواسطة بواسطة تأثير التكتلات (التجمعات) في حقل بنسيلويل BlaR1 إكسو (ماكيني وآخرون McKinney *et al.*, 2001، زانج وآخرون Zhang *et al.*,2001). وبشكل استثنائي، تُولد حادثة واحدة للتحول العبري للإشارة الحالة للبروتين (proteolytic signal transduction) الثانية مثلما يحرض BlaR1 التحلل البروتيني لـ 14-

kDa BlaI إلى الجزء 11-kDa الذي من الواضح أنه فقد القدرة ليكون ثنائي الجزء (dimerize) ويرتبط بمحرض دنا. والنتيجة التخلص من كبح إنتساخ BlaZ وBlaR1، وتؤدي نتيجة التنظيم العالي الانتساخي إلى إنتاج BlaZ بيتالاكتاماز، نقل BlaZ إلى خارج الخلية، التحلل المائي لمضاد بيتالاكتام الحيوي، ومقاومة اللاكتام.

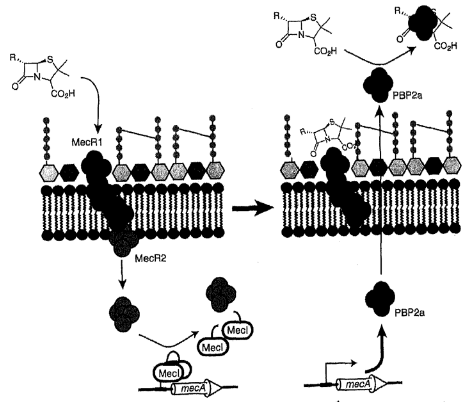


الشكل (٨,١١). المشغل الوراثي *blaR-blaI-blaZ* للمكورة العنقودية الذهبية ومسار إرتشاح الإشارة للتعبير عن BlaZ لكتاميز في المكورة العنقودية الذهبية: بترادف التحلل للبروتيني لـ BlaR1 وBlaI لتفعيل الجين.

تعدُّ BlaR1-BlaI من نظام ذا المكونات – الاثنين ومنطقياً مشابه لاثنين من مكونات – أنظمة الاستشعار / الاستجابة التنظيمية التي استخدمت أكثر من مرة عن طريق البكتيريا لتنظيم الجين في إنتاج المضادا الحيوي (CarR, CarI) ومقاومة المضاد الحيوي (VanS ,VanR) (انظر الفصل الخامس عشر)، ولكن يستعمل هؤلاء نقل مجموعة فسفوريل (phosphoryl group) (من ATP إلى مستشعر-His إلى منظم –Asp) كمعلومات كيميائية لتبديل الحالة من "إيقاف" (off) إلى "تشغيل" (on). وفي BlaR-BlaI نظام – المكونات الإثنين التبديل هو حال للبروتين (proteolytic). وبما أن التحلل البروتيني يعدُّ تبديل لا رجعة فيه بيولوجياً، بينما تعدُّ تحويلات الفوسفوريل تبديلات بيولوجية عكوسة (بفعل الفوسفتاز phosphatase action)، فيجب أن تتجدد بروتينات BlaR و BlaI بشكل مستمر، مما يفسر التنظيم ذاتي

التولد (autogenous regulation) لها. وهذا النظام لا يقتصر على المكورة العنقودية الذهبية ؛ لأنه قد تم الكشف عن مماثلات BlaR1 في سلالات العصوانية الهشة التي تنتج كذلك بيتالاكتاماز مُحرَّض.

وعلاوة على ذلك ، فقد تبين أن تنظيم عرض جين *mecA* وإنتاج PBP2A المرمز الذي يجعل مقاومة المثسيلين في MRSA تكون منظمة بالكامل بالمنطق الموازي، بواسطة النظام ذا المكونات- الاثنين *mecR1* و *mecI*، مرة أخرى مع تجمع (تكتل) الجينات بواسطة *mecA* للتنظيم المنسق (الشكل ٨,١٢). وكذلك يعتبر حقل إكسو التابع لـ MecR1 عبارة عن PBP، وهكذا فالأسر التساهمي للكتام يكون ببدأ حقل إنزيم لاكتامويل- PBP - أسيل (lactamoyl-PBP acyl enzyme domain) الإشارة عبر الغشاء بنفس توالي التحلل البروتني في *cis* للحقل السيتوبلازمي لـ MecR1 ومن ثم التحلل ترانس *trans* ليفلق MecI السليم ويخفف كبح جين *mecA*. إن غرس منتج جين *mecA* , PBP2A في داخل الغشاء يسمح بالربط – التبادلي للببتيدوغليكان الذي يعدُّ غير حساس للمثسيلين وغيره من مضادّات بيتالاكتام الحيوية. وقد يكون منطق التحلل البروتيني ذا المكونات – الاثنين هذا أكثر عمومية. وعلى أي حال فهو يطرح الاحتمال بأن مسارات الإشارة هذه للطريقين لتحريض مقاومة اللاكتام في المكورة العنقودية الذهبية يجب أن تكون أهداف جديدة لمسح وتصميم المضادّات الحيوية.



الشكل (٨,١٢). منطق نقل اشارة للتعبير المنظم لـــ MecA PBP2A ليحدث مقاومة للمثيسيلين في MRSA.

المكورة الرئوية

يؤدي البنسيلّين الخارجي في المكورة الرئوية إلى الزيادة في نشاط التحلل الذاتي للتحلل المائي للببتيدببتيدوغليكان والتعرض اللآحق للتحلل الأوزموزي (osmotic lysis) والموت . فقد أظهر التحليل الجيني (نوفاك وآخرون Novak *et al.*, 2000) منطق مسار نقل الإشارة مميز عن ذالك الذي يستعمل بواسطة الإشريكية القولونية والمكورة العنقودية الذهبية، تم شرحه سابقاً.

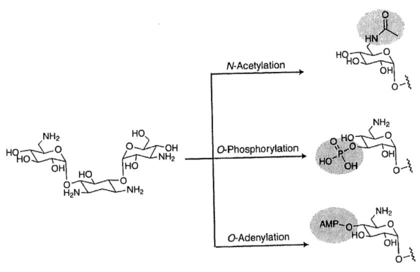
وكما سيتم شرحه في مكان آخر من هذا الكتاب (الفصل الخامس عشر)، تستعمل البكتيريا نوعان من أنظمة الإشارة لتوصل المعلومات من البيئة الخارجية عبر الغشاء إلى السيتوبلازم للتنظيم الجينى الانتقائي. أحدهما هو نظام – مكون البروتينات الاثنين، بواسطة إشارات عبر الغشاء لحقل بروتين هيستدين كيناز ومنظم الاستجابة الذي يعمل كعنصر انتساخ. ونظام الإشارة الثاني يعتمد على كثافة المزرعة البكتيرية ويستعمل جزيئات تفرز بواسطة خلية واحدة التي تنتشر نحو الجيران، ترتبط مع مستقبل/ وعنصر انتساخ، وتنشط الجينات مع التيار. وتعرف هذه بمستشعرات النصاب (quorum sensors) وفي البكتيريا الموجبة – لغرام تعمد؛ لأن تكون ببتيدات صغيرة. كما أن نظام المكونات – الاثنين (VncR-VncS) مطلوب لقتل البكتيريا بواسطة كل من الفانكوميسين والبنسيلّين (نوفاك وآخرون Novak, 2000)، ويفترض أن تحفز تنظيم الجين للإنزيم الذاتي الحال LytA، بواسطة تعطيل استشعار VncS في تركيب ببتيد الببتيدوغليكان ونزع فسفرة (dephosphorylating) VncR ليريح إعادة انتساخ الجين. وفقط عند منبع جينات *vncR* و *vncS* يوجد هيكل قراءة مفتوح يرمز ٢٧– فضالة ببتيد، Pep[27]، وثلاثة – بروتين ATP –الكاسيت الرابط – نوع مضخة ATPase (three-protein ATP-binding cassette-type ATPase pump) لتضخ Pep[27] خارجاً لتعمل كمستشعر للنصاب وببتيد محرض للموت على خلايا المكورة الرئوية المجاورة. والتفاعل بين Pep[27] والمضادّات الحيوية (مثال، كروابط لـ؟ VncS عبر الغشاء) ليشغل التتالي الحال غير المفهوم ولكن قد يكون نقطة تقاطع مثمرة لأهداف مضادّات حيوية جديدة في المكورة الرئوية.

الإنزيمات المُعدلة– للأمينوغليكوسيد

لا يوجد لمضادّات الأمينوغليكوسيد (أمينوسيكليتول aminocyclitol) الحيوية رأس حرب كيميائي مقارنة بالبيتالاكتام الذي يعتبر قلب الوحدة المؤسلة المطمورة في جميع أنواع البنسيلّين، الكيفالوسبورينات، الكاربابينيمات والمونوبكتامات. وبالعكس فقد لاحظنا أن الأمينوغليكوسيدات تقرأ مواقع معينة من 16S rRNA في الوحدة الفرعية 30S بواسطة شبكة ربط الهيدروجين (انظر الفصل الرابع) خلال مختلف بدائل الهيدروكسيل والأمينو على حلقة سيكليتول لتتيح موقع إرساء عالي – الانجذاب لهذا الصنف من المضادّات الحيوية. وإستراتيجية التدمير الإنزيمية للبكتيريا المقاومة – للأمينوغليكوسيد هي لتعدل تساهمياً تلك المجموعات OH and NH_2 التي تتيح

– النوعية في الأمينوغليكوسيدات وبذلك تعترض مع التمييز بواسطة 16S rRNA. وفي بعض البكتيريا مثال السالبة – لغرام الزائفة الزنجارية المُمْرضة، وبإمكان الغشاء الخارجي أن يكون كذلك حاجز أولي مهم لإدخال الأمينوغليكوسيدات، بواسطة كل من التقليل من عدد قنوات المسامات في الغشاء الخارجي وكذلك بواسطة التعديلات في النشرة الخارجية لعديد السكريد الشحمي (ليفرمور Livermore, 2000، بول Poole, 2001).

توجد ثلاثة أنواع من التعديلات الإنزيمية لمجموعات OH and NH_2 على الأمينوغليكوسيدات وهي محددات شائعة للمقاومة وتمثل متغايرات لإنزيمات النقل للمجموعة الأليفة للكهرباء الطبيعية التي تساهم في الإستقلاب الأولي (للمراجعة انظر كوترا وآخرون Kotra *et al.*, 2000، ورايت Wright, 1999). وATP هو أحد هذه المتفاعلات، ويستعمل في كل من نقل أو – فوسفوريل (*O*-phosphoryl)، بواسطة مهاجمة مجموعة γ-PO_3 بـOH أو NH_2 أليف النواة على α-P التابابع لـ ATP لنقل شطر AMP (الشكل ٨،١٣). والثاني هو مفعل ديناميكيا وحرارياً ولكنه مادة مشاركة وثابتة حركياً في المجموعة أليفة الكهرباء للنقل الإنزيمي وهي acetyl-CoA ومجموعة NH_2 للأمينوغليكوسيدز التي تهاجم شطر أسيتيل ثيوإستر لتنقل مجموعة الأسيتيل. وتعدُّ جميع التفاعلات الثلاث– الفسفرة (phosphorylation) –الأدنلة (adenylation) والتأستل (acetylation) – غير عكوسة، ومدفوعة بواسطة 7 kcal/ mol الذي تم إطلاقه ويتوافق مع K_{eq} of 10^5 (والش Walsh, 1979) لصالح تعديل الأمينوغليكوسيد.



الشكل (٨،١٣). ثلاث طرق إنزيمية لتعطيل نشاط الامينوغليكوسيد: التأستل بواسطة أسيتيل –CoA، الفسفرة بواسطة ATP، والدنلة بواسطة ATP.

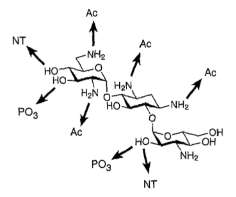
من المحتمل أن الإنزيمات –المعطلة لنشاط المضاد الحيوي سوف تنشأ من أدينيل ترانسفيرازات (نواقل الأدينيل) (adenyltransferases)، فوسفوترانسفيرازات (نواقل الفوسفور) (phosphotransferases)، *وإن* –أسيتيلترانسفيرازات

(نواقل الأسيتيل) (*N*-acetyltransferases) التي تم إطلاقها من عمليات البناء الحيوي الطبيعية في الخلايا البكتيريا. وعلى سبيل المثال، فتحديد تركيب أشعة – إكس لـ APH(3') IIIa phosphotransferase من المكورات المعوية قد أظهر تشابع عالي لسيرين سويات النواة/ ثريونين بروتين كينازات (euokaryotic serine / threonine protein kinases)، بما يتفق مع النشوء من تمييز ركيزة البروتين–OH للهجوم على γ-PO_3 من ATP لتمييز هيكل أمينوسيكليتول–OH (هون وآخرون Hon *et al.*, 1997) تحت الضغط الانتقائي للبقاء. ونظراً لتعدد مجموعات OH and NH_2 في الأجيال المتعاقبة للأمينوغليكوسيدات لرؤية الاستعمال السريري، فإنه ليس من المستغرب بأن تنشأ الإنزيمات المعدلة للنوعية الموضعية المتميزة للتأستل، الفسفرة والأدنلة. ويظهر الشكل (٨,١٤) النمط النوعي للتعديل التساهمي لهيكل أمينوغليكوسيد ثلاثي الحلقة. لقد تم وصف أكثر من ٣٠ من الأشكال المشابهة لهذه الأنواع الثلاثة من الإنزيمات في البكتيريا المقاومة – للأمينوغليكوسيد، وتشمل بروتين الاندماج (fusion protein) مع اثنين من الحقول المحفزة، حقل أدينيلترانسفيرازات وفوسفوتراسفيرازات (كوترا وآخرون Kotra *et al.*, 2000). يُصنف إن– أسيتيلترانسفيرازات حسب انتقائيته الموضعية لتأستل –N_1,N_2,N_3- or N_6' مع N_6' العائلة الفرعية الأكثر شيوعاً من امينوغليكوسيد أسيتيلترانسفيرازات، التي تظهر نوعية واسعة نحو سقالات الأمينوغليكوسيد. كما أن وجود جينات الإنزيمات المعدلة على البلازميدات القابلة للانتقال يساعد على انتشار محددات المقاومة وربما يسرُع نشوء النشاط المحفز نحو الأمينوغليكوسيدات التي أدخلت حديثاً.

وقد تم وصف بعض الإستراتيجيات التي تخرب التعديل الإنزيمي بواسطة مباشري وزملائه (Mobashery *et al*)، الذين يدرسون أحد أمينوغليكوسيد *O*- ترانسفيرازات. وعلى سبيل المثال يعاد ترتيب شبيه الأمينوغليكوسيد بمجرد أن يفسفر إنزيمياً إلى الأنواع الفعالة التي تعدل (تحول) تساهمياً *O*- phosphotransferase وتبعدها عن العمل (روستامدجي وآخرون Roestamadji *et al.*, 1995).

تشبه عائلة أسيتيل ترانسفيرازات المعطلة لفعاليّة فيرجينياميسين/ستربتوجرامين (-virigniamycin / streptogramin inactivating acetyltransferases) أسيتيلترانسفيرازات المعطل لفعاليّة أمينوغليكوسيد الملقبة Vats (لفيرجينياميسين أسيتيلترانسفيرازات). ولقد لاحظنا في الفصل الرابع أن سينرسيد (Synercid) هو توليفة من ستربتوجرامين A ومكونات ستربتوجرامين B وأن مثيلة (methylation) 23S rRNA المتواسطة بـ Erm تؤدي إلى مقاومة ميكروليد–لينكوسميد–ستربتوجرامين B، معطلة ربط مركب الستربتوجرامين B. وبالإمكان إزالة مركب ستريتوجرامين A بواسطة التدفق (بواسطة الآليات التي شرحت في الفصل التاسع) أو بواسطة التأستل–*O* على مجموهة هيدروكسيل حرة ومفردة (انظر الشكل ٤,٩ لتركيب دالفوبرستين dalfopristin). ولقد تم حل تركيب أشعة–إكس لـ VatD acetyltransferase

من المكورة المعوية البرازية (سوجانتينو وروديريك Sugantino and Roderick, 2002)، مما قدم نظرة ثاقبة للتصميم الهندسي لهذا الدواء- المعطل لنشاط الإنزيم لمكونات الستربتوجرامين A.



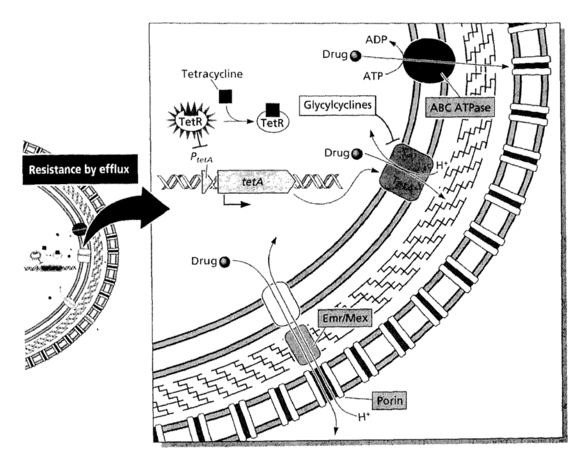
الشكل (٨,١٤). أنماط التعديل الإنزيمي الإنتقائي الموضعي وتعطيل نشاط مضادّات الامينوغليكوسيد الحيوية. NT: نقل النيوكليوتيديل، PO_3: نقل الفوسفوريل، Ac: نقل الأسيتيل.

تعطيل النشاط الإنزيمي للفوسفوميسين (Fosfomycin)

يعدُّ الفوسفوميسين شبيه لمضادّات بيتالاكتام الحيوية بمعنى أن لها كذلك رأس حرب كيميائي فعال، إيبوكسيد (epoxide) ثلاثي - الحلقة، مطمور في تركيبه الكيميائي البسيط (الشكل ٨,١٥). وتهاجم الإيبوكسيد بواسطة سلسلة الحمض الأميني الجانبية الفعالة، وفي هذه الحالة هي SH- من Ser في PBPs، في هدفها الإنزيم MurA عند بداية تجميع الببتيدوغليكان (انظر الفصل الثالث). يترك الموقع النشط لـ MurA المشتق تساهمياً الإنزيم عاجزاً عن بدء تكوين إينول بيروفيل إيثر (enolpyruvyl ether) في تحويل UDP-GlcNAc إلى UDP-MurNAc. وكذلك يشبه تدمير حلقة البيتالاكتام بواسطة الأسر الإنزيمي للبيتالكتام النشط بواسطة أليف النواة البديل، الماء في حالة البيتالاكتامازات، يُحفز تدمير الفوسفوميسين بواسطة الإنزيمات التي تأسر الإيبوكسيد مع المادة المشاركة أليفة النواة القابلة للذوبان، وفي هذه حالة أنيون ثيوليت النشط (thiolate anion) للغلوتاثيون ثلاثي الببتيد (γ-Glu-Cys-Gly). والفوسفوميسين غلوتاثيون إس- ترانسفيراز (fosfomycin glutathione S-transferase) (FosA) هو مانجنيز إنزيم ممعدن (manganese metalloenzyme) (بيرنات وآخرون Bernat *et al.*, 1997) (الشكل ٨,١٥) الذي يولد فتح- الحلقة 2-OH ثيوإيثر المقربة حيث يعطل نشاط رأس حرب الإيبوكسيد بمجرد أن يضاف جلوتاثيون ثيول (glutathione thiol) إلى C_1. والغلوتاثيون هو الثيول الخلوي قليل- الوزن الجزيئ الأكثر وفرة في معظم الخلايا البكتيرية وسويات النواة، ويصل إلى مستويات ١ - ١٠ Nm. ويستعمل في لحماية ونزع سمية المجموعات الكيميائية النشطة، كما في هذا المثال، بواسطة التنشطية العالية لثيوليتها الأليف النواتي. ولإنزيم FosA تشابه مع كل غليوكساليز (glyoxalase)

كاتيكول (catechol) المعتمد– على المعدن – ليفلق دي أوكسيجيناز (dioxygenase) (بيرنات وآخرون .,Bernat *et al* 1997)، تطابقاً مع النشوء من الإنزيمات المحلية للأيض الأولي والثانوي.

الشكل (٨,١٥). التعطيل الإنزيمي لنشاط فوسفوميسين بواسطة فتح حلقة إيبوكسيد مع غلوتاثيون.



المقاومة بواسطة فعل H^+ و ATP المقترن بمضخات التدفق في الأغشية البكتيرية.

الفصل التاسع

مقاومة المضادّات الحيوية بواسطة مضخات التدفق
ANTIBIOTIC RESISTANCE BY EFFLUX PUMPS

الطريقة الرئيسية الثانية التي تتجلى بها مقاومة الدواء في البكتيريا هي بواسطة التصدير النشط أو تدفق المضاد الحيوي للخارج بحيث إن التراكيز العلاجية لا يتم بلوغها في السيتوبلازم البكتيري. ويُركز الشكل في مقدمة الفصل على جزء من الشكل (٢,٢) الذي يتناول المقاومة بواسطة التدفق النشط للمضادّات الحيوية.

ويتواسط التدفق النشط بواسطة البروتينات عبر الغشاء، في كل من الأغشية السيتوبلازمية وكذلك في الغشية الخارجية للبكتيريا السالبة – لغرام، وتعمل البروتينات عبر الغشاء بمثابة مضخات تصدر المضادّات الحيوية، وفي كثير من الأحيان ضد تدرجات التركيز (الجدول ٩,١). ويمكن أن يكون التدفق النشط ذا صلة سريرياً بمضادّات بيتا لكتام الحيوية، الميكروليدات، ببتيدات بريستيناميسين، الفلوروكوينولونات، والتراسيكلينات الأكثر كلاسيكية. وكما سنرى أدناه، بعض مضخات التدفق لها خصوصية (نوعية) ضيقة نسبياً مثال، مضخات التراسيكلين، في حين أن البعض الآخر له احتمال (tolerance) واسع ويضفي الأنماط الظاهرة للمقاومة المتعدِّدة الأدوية (Mdr). وللبكتيريا أعداد كبيرة من مضخات التدفق، وتستعمل فسيولوجياً لتصدير الأيضات ولتضخ للخارج المواد السامة الغريبة. ومجموعة المضخات المتكاملة ذات الأنشطة المتداخلة يمكن أن تؤدي إلى قدرة (سعة) ملحوظة لضخ المضادّات الحيوية إما كقدرة أيضية مشفرة صبغوياً والتي تجعل الزائفة الزنجارية غير حساسة داخلياً للمضاد الحيوي، وإما بواسطة إكتساب جينات ضخ محمولة على البلازميدات والترانسبوزونات (الينقولات).

أصناف مضخات تدفق الغشاء

من تحليل المعلوماتية الحيوية تم وصف أربعة من عائلات بروتينات مضخات التدفق التي يمكن أن تعمل في مقاومة المضادّات الحيوية (الشكل ٩,١). والثلاث الأولى تزاوج (تربط) تدفق الدواء نحو عكس اتجاه البروتونات، أو في بعض الأحيان نحو أيونات الصوديوم (Na^+ ions)، بينما تستعمل العائلة الرابعة التحلل المائي لـ ATP لتوفير الطاقة للتصدير النشط للمضاد الحيوي أو مركب آخر غريب خارج الخلية (بولسن وآخرون Paulsen *et al.*, 1996).

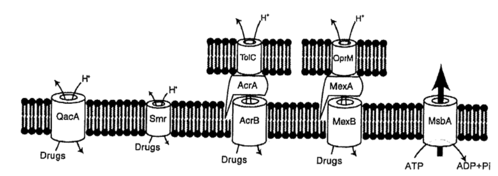
تصنف المضخات التي تدفعها قوة بروتون الحركية (proton motive force)(Δ pH) تحت العائلة الفرعية الكبيرة الميسرة (major facilitator subfamily (MFS)) والعائلة الصغيرة المنظمة للعديد من الأدوية (the small multidrug regulator (SMR) family))، أو عائلة RND (المقاومة/ التعقد/ انقسام الخلية) (resistance/ nodulation/ cell division)، استناداً على الحجم البارز والحاجة لبروتينات شريكة ووحدات فرعية. والفئة الرئيسة الثانية من مضخات التدفق، تلك التي تحلل مائياً ATP، وتسمى عائلة الكاسيت الرابط-ATP (ATP-binding cassette (ABC) family). التوجه التخطيطي للأصناف الأربعة من مضخات التدفق في الغشاء السيتوبلازمي البكتيري يظهر في الشكل (٩،١)، مع تدفق معاكس لأيون الهيدروجين H^+ أو التحلل المائي لـ ATP كآلية اقتران إلزامية للتدفق. في حين أن المضخات المدفوعة بـATP هي السائدة في سويات النواة، ومضادّات الحُمال (الناقلين)- المشتقة من البروتون (the proton-driven antiporters) تسود في الجينات البكتيرية.

وعلى سبيل المثال، يتوقع أن يكون للإشريكية القولونية أعضاء 18MFS,3 to 4 SMR and 5 to 6 RND، ليصبح المجموع ٢٦ مضخات تدفق مدفوعة بواسطة التدفق المعاكس للبروتونات، مقارنة فقط ٣ - ٦ مضخات ABC-type ATPase (بورجيز - والمسلي ووالمسلي Borges-Walmsley and Walmsley, 2001، ساير وآخرون Saier *et al.*, 1998). والمزيد من الحواشي (annotation) قد رفع الإجمالي المعروض من ٣١ - ٣٧ جينات متوقعة ناقلة للدواء للإشريكية القولونية (نيشينو وياماجوتشي Nishino and Yamaguchi, 2001).

الجدول (٩،١). موجز لجوانب مقاومة الدواء التي قررت للمقاومة-متعدِّدة الدواء-الحفّازة لمضخات التدفق (عدلت من بوتمان وآخرون Putman *et al.*, 2000).

	MFS						SMR	RND						ABC
	12-TMS cluster				14-TMS cluster									
Drug	Blt	Bmr	EmrD	NorA	EmrB	VceB	EmrE	AcrB	AcrF	MexB	MexD	MexF	MexY	LmrA
Aminoglycosides		−					−	−		−	−	−	+	+
β-Lactams														
Carbapenems							−			+		−		−
Cephalosporins							−			+				+
Penicillins								+	+	+	−			+
Chloramphenicol		+	−	+	−	+	−	+		+	+	+		+
Glycopeptides							−	−	+					−
Lincosamides														+
Macrolides														
14-Membered		−		−	−	+	+	−	+	+	+	−	−	+
15-Membered										+	+			−
16-Membered														
Novobiocin						−		−	+	+				
Quinolones														
Hydrophilic	−	+	−	+	−	−		+		+	+	+	+	−
Hydrophobic		−	−	+	+	+		−		+	+		−	+
Rifampin						−		+	+					
Sulfonamides										+				
Tetracyclines		−		−	−	−	+	+	+	−	+	+		+
Trimethoprim										+		−		-

بالإذن من بوتمان وآخرون Putman *et al.*, 2000.

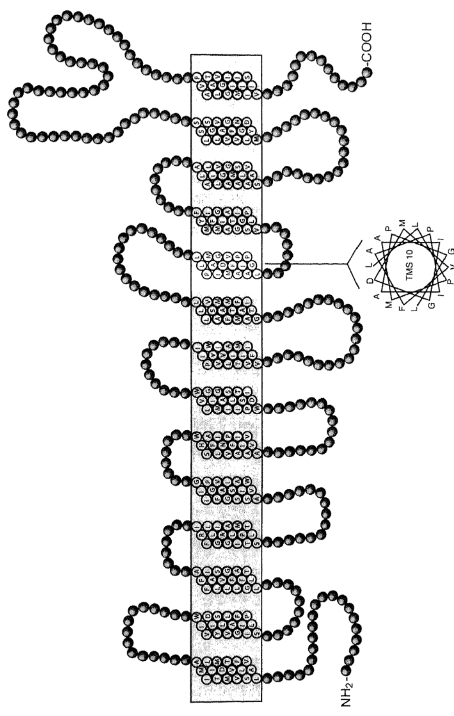


الشكل (٩,١). أربع عائلات بروتين فرعية للمضخات التدفق المعتمدة على-البروتون وعائلة ATPase لمضخة التدفق في المقاومة للمضاد الحيوي. (بالإذن من بولسن وآخرون Poulsen *et al.*, 1996).

العائلة الفرعية MFS ، ممثلة بواسطة QacA (مركبات الأمونيوم الرباعية (quaternary) ammonium compounds (QAC)، التي تستعمل كمطهرات (disinfectants) ومانعة للعفونة (antiseptics)، كانت من بين أول المركبات الترابطية (ربيطة) التي تم الكشف عنها لتكون مواد لمضخة التدفق هذه) في الشكل (٩,١) لها أكثر من ٣٠٠ أعضاء محتملين في بدائيات النواة وسويات النواة ويشمل عائلة إنزيم لاكتوز النفوذي (lactose permease) البكتيري LacY وglut من نواقل الغلوكوز في الإنسان. ويحتمل أن يكون الإستعمال لبعض أعضاء العائلة البكتيرية لتدفق الدواء، تغيير طفيف لنطاق واسع من الوظائف الفسيولوجية. يظهر الشكل (٩,٢) أن كل من النهايات الطرفية N-and C-terminals لمضخات MFS يحتمل أن تكون على الوجه السيتوبلازمي، كما هو ممثل في هذا الإحتمال لبروتين QacA للمكورة العنقودية الذهبية. ويُعتقد بأن النهايات N لبروتينات الغشاء MFS تكون مشتملة في تنشيط النقل في حين أن النهاية C، الأكثر تغاير في التسلسل، قد تكون مشاركة في التمييز النوعي للربيطة للتصدير.

يتوقع أن يكون لبعض مضخات MFS ١٤ لفة حلزية عبر الغشاء: QacA, EmrB في الإشريكية القولونية، TetK من المكورة العنقودية الذهبية، TetL من العصية أليفة الحرارة العالية (Bacillus sterothermophilus)، وTcmA من الكائن المنتج المتسلسلة جلوسينسيز *(Streptomyces glaucescens)* للتتراسينوميسين (tetracenomycin). وأُخر لها١٢حقول TM محتملة: Blt و Bmr من العصية الرقيقة، EmrD من الإشريكية القولونية، NorA من المكورة العنقودية الذهبية، والبروتينات TetA,TetG and TetH من سلسلة من البكتيريا السالبة- لغرام (لوموفيسكايا وآخرون Lomovskaya *et al.*, 2001). ولقد أنتجت بلورات ثنائية- الأبعاد لمضخة TetA، وأدت إلى نماذج (مجسمات) تركيبية ذات تمييز (تفريق)- منخفض (ين وآخرون Yin *et al.*, 2000). وأحد الفرضيات حول مصدر هذه العائلات الفرعية MFS هي النشوء بواسطة ازدواج الجين من طليعة جين ٦- عبر الغشاء شائع. وربما توظف مضخة QacA من تلقاء نفسها في سلالات المكورة العنقودية الذهبية الموجبة- لغرام، كما هو الحال مع مضخات التتراسيكلين TetK و TetL من السلالات الموجبة- لغرام. وللمضخات في السلالات السالبة- لغرام بروتينات شريكة في كل من الجبلة والغشاء

الخارجي، المبينة في الشكل (٩،١) لـ EmrB, EmrA، وشريك آخر في الغشاء الخارجي لم يحدد بعد، ربما يكون هو البروتين TolC.



الشكل (٩،٢). اتجاه مضخات MFS المحتملة في الغشاء السيتوبلازمي البكتيري. (بالإذن من بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 1996).

العائلة SMR هي بروتينات 12-kDa صغيرة، ولها أربع حقول عبر الغشاء محتملة، وربما تعمل كموحودات (oligomers). ويحتمل أن يكون لمضخات العائلة RND ١٢ حقول TM، ومرة أخرى ربما تنشأ بواسطة ازدواجية الجين من طليعة 6 -TM. وفي الإشريكية القولونية تشتمل هذه العائلة على مضخات AcrB و AcrF (ACR تُرمِّز لمقاومة الأكريدين acridine resistance)، وفي الزائفة الزنجارية تشمل MexB (الشكل ٩،١) و MixD، وفي العزل السريري للنيسيرية السيلانية *(Neisseria gonorrhoeae)* المضخة هي MtrD.

ولقد تم وصف جميع مضخات نقل الدواء الثلاثين المحتملة والمشتقة من بروتون- الإشريكية القولونية (أعضاء العائلة 20MFS, 3SMR,and 7RND) في بلازميدات متعدِّدة النسخ في طفرة الإشريكية القولونية التي تفتقر إلى مضخة التدفق AcrAB (نيشينو وياماجوتشي Nishino and Yamaguchi, 2001) وتم تقييمها لزيادة المقاومة لثلاثة عشر مضاد حيوي. انضمت ستة منتجات جين جديدة إلى ١٣ مضخة معروفة لتعطي ٢٠ من الجينات التي تضفي مقاومة دواء اثنين- طية أو أكثر لواحد على الأقل أو أكثر من المضادّات الحيوية. وهذا قد يصنع مجموعة مكتبة مفيدة للبحث عن مضادّات حيوية جديدة مرشحة لتكون حساسة لهذه المجموعة من المضخات.

العائلة الرابعة هي عائلة ABC من ATPase. وهي تمثل الأقلية من مضخات تدفق المضاد الحيوي ولكنها شائعة للغاية من نظام النقل عبر الغشاء. وعلى سبيل المثال، ويقدر أن يكون ABC-type ATPase 70 مشفر في مجين الإشريكية القولونية، وتمثل ما يقرب من ٥٪ من الجينات. التنظيم النموذجي لبروتينات ABC هو أن تكون جزءاً من أنظمة نقل الغشاء متعدِّدة المكونات، ويشمل مكونات البروتين الجبلِّي. وفي الإشريكية القولونية، يتوقع أن تكون جينات ABC 44 جزء من أنظمة القبط (الامتصاص) من الجبلة في حين أن ١٣ يتوقع أن تكون مخصصة لتصدير الربيطة. ويشمل تنظيم الحقل النموذجي حقلين ذوي رهبة للماء (hydrophobic)، مطمورين كمسامات عبر الغشاء، وحقلين أليفين للماء (hydrophilic) على الوجه السيتويلازمي للغشاء اللذين يفيدا كربط لـ ATP ومواقع التحلل المائي. وتشاهد مختلف التشكيلات (configurations) للحقول، من أربعة-حقول عديد الببتيد مفرد إلى أربع وحدات فرعية منفصلة. ويحدث التشكيل الأخير في نظام مالتوز النفوذي (مالتوز بيرمياز) (maltose permease system) في الإشريكية القولونية MalG. MalF. $(Malk)_2$، حيث إن MalK هو الوحدة الفرعية ABC (الشكل ٩،٣). ولقد تم وصف تركيب أشعة -إكس لحقل ربط النيوكليوتيد (nucleotide binding domain (NBD)) الخاص بمضخة MalK (هونج وآخرون Hung *et al.*, 1998)، معطياً صورة أساسية لحقل ATPase الحفّاز ولكن لا يظهر كيف يتفاعل NBD مع حقول عبر الغشاء (transmembrane domains) (TMDs)، وكيف أن رُسو معقد Malk-ATP مع وحدة الغشاء الفرعية MalF/MalG يثير التحلل المائي لـ ATP، أو كيف تستخدم الطاقة المخزنة للتغييرات التكوينية للبروتين لتفتح مؤقتاً مسام للمالتوز ليضخ للداخل.



الشكل (٩،٣). نظام نقل مالتوز الإشريكية القولونية: الشكل الهندسي لمثنوي MalK. (بالإذن من ديديريتشز وآخرون Diederichs *et al.*, 2000).

ولقد تم الحصول على حدث مهم في فهم التصميم الهندسي للناقل ABC-type بواسطة تبلور لبروتين MsbA من الإشريكية القولونية، عند تفريق- منخفض نسبياً (4.5 Å) (تشانج وروث Chang and Roth, 2001)، ولكنه كافي ليظهر توجه NBDs نحو TMDs ويسمح للنموذج لعمل الناقل. والـ MsbA مشابه لـ MDR-1 في البشر و MDR3 في الفئران، ونواقل المقاومة متعدِّدة الدواء واتي يعتقد بأنها تعمل فسيولوجياً كشحم (كدهن) وشحم فوسفوري (phospholipid) "فليبازات" "flippases"، لتنقل جزيئات الشحم الفسفوري من الطبقة الداخلية إلى الطبقة الخارجية لطبقة الغشاء الثنائية. وينقل MsbA الإشريكية القولونية الدهن (الشحم)A (lipid A) (انظر الفصل الخامس عشر) خلال الغشاء الداخلي إلى الغشاء الخارجي للغلاف السالب-لغرام، حيث يعدُّ الشحم A مكون تركيبي رئيس. ويقترح بأن MsbA وشبيهاته يعمل "كمكانس كهربائية راهبة للماء" " hydrophobic vacuum cleaners" لتزيل الدهن والدوية الراهبة للماء من وريقة الغشاء الداخلي (تشانج وروث Chang and Roth, 2001، رافيف وآخرون Raviv *et al.*, 1990). يتبلور Msba كمثنوي متجانس (homodimer)، مع حقل اللفات الحِلزية عبر الغشاء (بطول52 Å) لتمد الغشاء عند ميلان ٣٠ – ٤٠° من المستوى الطبيعي للغشاء، لتوجد حجرة (غرفة) بين المثنويات تكون كبيرة بشكل كاف لترتبط بربيطة الدهن A (lipid A ligand A) (الشكل ٩،٤). ويعتقد بأن المنطقة التي تربط بين TMD و NBD، المعششة في الموقع المائي على الجانب السيتوبلازمي من الغشاء، بأنها تقترن بالتغييرات التكوينية من ربط ATP والتحلل المائي في NBD نحو TMD في الغشاء. والنماذج المقترحة بواسطة تشانج وروث Chang and Roth, 2001) تسمح بتوظيف الدهن أو الدواء من الوريقة (السيتوبلازمية) السفلى من الطبقة الثنائية للغشاء إلى داخل الحجرة كخطوة ربط/وفصل (عزل) (الشكل ٩،٤ B). ويستشعر ربط ATP إلى NBD بواسطة TMDs التي تتناوب لتغلق الحجرة وتجلب مجموعة من الشحنات من اللفات الحِلزية TM إلى داخل الحجرة المغلقة. وهذا سوف يزعزع ثبات

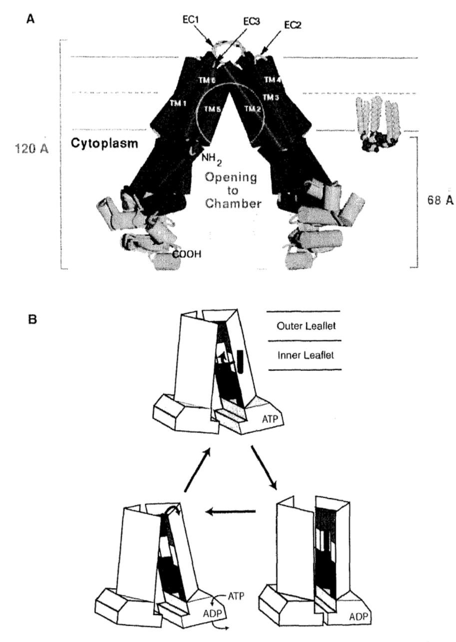
البيئة الدقيقة للربيطة الراهبة للماء، والسماح بالتقليب نحو الموضع النشط الأكثر ملاءمة في الجزء العلوي من الحجرة استعداداً لدخول الوريقة الخارجية للغشاء (تشنج ورووث Chang and Roth, 2001). وفي حين أنه قد لا يكون MsbA النموذج الجيد للنواقل التي تحرك الربيطات الراهبة أليفة الماء، فمن الأرجح أن يكون نموذجاً لنواقل ABC التي تحرك تلك الراهبة للماء، ويشمل المضادّات الحيوية. ولاحظ تشانج ورووث، (Chang and Roth, 2001) بأن الحجرة يمكن أن تستوعب وتنقل تشكيلة واسعة من الجزيئات، متطابقة مع الانتقائية المنخفضة للنواقل من النوع- MDR، وأيضاً أن MsbA (والنواقل ذات العلاقة) لا تعمل كمضخة ولكن "كماكينة جزيئية تمسح وريقة الطبقة الثنائية السفلى للركائز، وتقبلهم جانبياً، وتقلبهم إلى وريقة الغشاء الخارجي".

الناقل البكتيري الثاني من النوع ABC، في هذه الحالة هو زوج البروتين BtuCD للإشريكية القولونية، ينقل الربيط أليف الماء فيتامين B_{12}، تم كذلك حله مؤخراً بواسطة تحليل أشعة- إكس عند تفريق 3.2 Å (لوشر وآخرون Locher *et al.*, 2002). والناقل الوظيفي هو المربوع المغاير $BtuC_2BtuD_2$ (heterotetramer)، حيث الوحدة الفرعية BtuC تعدُّ كصمولة للغشاء، ذات ١٠ لفات ألفا -حلزية (α-helices) لكل وحدة الفرعية، وBtuD هو كاسيت ATPase. وفيتامين B_{12} على الوجه الجِبِلّي يقدم نحو الوجه الخارجي لـ $BtuC_2$ بواسطة البروتين الرابط الجِبِلي BtuF، ويبدأ إشارة عبر الغشاء التي تؤدي إلى التحلل المائي لـATP وضربة القوة المفترضة التي تفتح القناة بين الوحدات الفرعية BtuC ليسمح بمرور فيتامين B_{12}.

يعتبر توجيه حقول ATPase نحو جزء البروتين الممتد- للغشاء (membrane -spanning protein) وكذلك العدد وتوجيه اللفات الحلزية في BtuC مختلف عن الناقل MsbA. وسوف توجد النواقل الاثنين المتغايرة ABC برنامج جديد لتصميم وتحليل الربيطات البديلة ومحصرات لوظيفة القناة.

وفيما يتعلق بمضخات المضاد الحيوي في عائلة ABC، المقاومة للإريثروميسين في العزل السريري للمكورة العنقودية البشروية *(Staphylococcus epidermidis)* (تشو وآخرون Chu *et al.*,1996) هي بسبب جين *msrA*، الذي يُرمِّز (يشفر) مثل الوحدة الفرعية ATPase لضخ الإريثروميسينات وبريستينوميسينات (pristinomycins) للخارج. وكذلك، مضخة LmrA من المكورة اللبنية لاكتيس *(Lactococcus lactis)* هي مضخة MDR واسعة-المدى. عندما أظهرت المرشحات الخمس من نوع -ABC أطر (هياكل) فتح القراءة من الإشريكية القولونية وحللت كمضخات تدفق للميكروليد إريثروميسين، تم العثور على زوج الجين *ybjYZ* لترميز مثل هذه المضخة ومن ثم تمت إعادة تسميته *macAB* (كوباياشي وآخرون Kobayashi *et al.*, 2001، انظر كذلك نيشينو وياماجوتشي Nishino and Yamaguchi, 2001). ويعتقد بأن MacA يمر خلال الغشاء السيتوبلازمي مرة واحدة ويكون معظمه في الجِبِلَة، في حين يعتقد بأن MacB يكون بروتين داخل الغشاء الداخلي مع الحقل السيتوبلازمي ATPase. وكما لوحظ في الشكل

(٩,١) وشرح أدناه، هناك حاجة لبروتين خارج الغشاء لتكملة تدفق الربيطة عبر الغشاء الخارجي ويزود بواسطة البروتين TolC. ونظراً لتراكيب أشعة-إكس لـ MsbA (الشكل ٩,٤) و TolC (انظر الشكل ٩,٦)، فنحن نقترب من معرفة التصميم الهندسي الجزيء لمضخات تدفق المضاد الحيوي متعدِّدة المكونات.

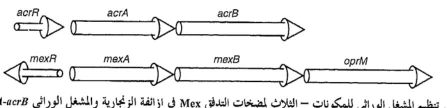


الشكل (٩,٤). رسم تخطيطي لنواقل ABC .(A) المثنوي MsbA وتوجيهه نحو وريقات الغشاء ثنائي الطبقة. (B) رسم لناقلة الدهن A بواسطة الإشريكية القولونية MsbA. (بالإذن من تشانج وروث Chang and. Roth, 2001).

وظيفة مضخات MFS وRND في التدفق الفسيولوجي والمضاد الحيوي

بدأ الدور الفسيولوجي لمختلف مضخات MFS و RND أن يُحل ليعطي بعض المفاتيح عن كيف يمكن أن يتكيفوا أو أن يَستولى عليهم لتدفق زينوبيوتك (xenobiotic) أو المضاد الحيوي. ويظهر أن مضخة Blt من العصية الرقيقة تستعمل لتدفق سبيرميدين (spermidine) وتنتسخ مع سبيرميدين أسيترانسفيريز (spermidine acyltranferase) (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 1996). وهو محبوس لتصدير المضاد الحيوي. كما يظهر بأن مضخة Ptr من عائلة MFS في المتسلسلة بريستينيسبيراليز *(Streptomyces pristinaespiralis)* تكون مضخة مناعة ذاتية (autoimmunity pump) لهذا الكائن عندما تبدأ تشغيل إنتاج بريستيناميسينات I وII؛ لأن كل منهما يحرض إنتساخ ptr. ولقد لاحظنا مضخة تدفق OleB للغليكوزيل-أوليااندوميسين في المنتجين المتسلسلة أنتيبيوتيكس *(Streptomyces antibioticus)* في الفصل السابع كجزء من آلية المناعة لمضادّاتها الخاصة.

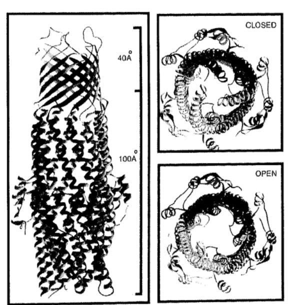
في مضخات العائلة الفرعية RND، افترض بأن المُشغِل الوراثي MexA-MexB-OprM (الشكل ٩،٥) يشارك في إفراز الببتيد غير الريبوسومي حامل الحديد بيوفيردين (siderophore pyoverdin) بواسطة الزائفة الزنجارية في البيئات الدقيقة ناقصة الحديد.



الشكل (٩،٥). تنظيم المشغل الوراثي للمكونات – الثلاث لمضخات التدفق Mex في ازائفة الزنجارية والمشغل الوراثي *acrA-acrB* في الإشريكية القولونية.

ويتطلب وجود اثنين من حواجز الغشاء في البكتيريا السالبة –لغرام مكوَن مضخة في كل من الإغشية الداخلية والخارجية وبعض بروتينات التوصيل لتكون جسراً للجبلَة أو لتجعل الغشائين في اتصال مؤقت (الشكل ٩،١). هذا الثلاثي من البروتينات جند لتدفق التتراسيكلينات، سبروفلوكساسين، كلورامفينيكول، وبيتالكتامات. وفي الحقيقة توجد أربعة من مثل مضخات التدفق من عائلة RND متعدِّدة المكونات في الزائفة الزنجارية، مع نطاقات متداخلة لضخ المضادّات الحيوية للخارج بحيث إن المجموع يجعل المرض غير حساس داخلياً لمعظم المضادّات الحيوية. وربما يكون لنظام Acr في الإشريكية القولونية دور فسيولوجي لضخ حمض الصفراء والأحماض الدهنية للخارج لتقليل سميتها (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*,1996). AcrB هو مركب بروتين الغشاء الداخلي، بينما AcrA يعتقد بأنه يمد الجِبلَة (الشكل ٩،١) ويتفاعل مع المسام العام للغشاء الخارجي/ بروتين القناة، المقترح على الخلفية الوراثية لأن يكون البروتين TolC (فراليك Fralick, 1996). TolC كما لوحظ أدناه كعنصر (مركب) لقناة الغشاء الخارجي لنظام إفراز الحال الدموي (hemolysin secretion system).

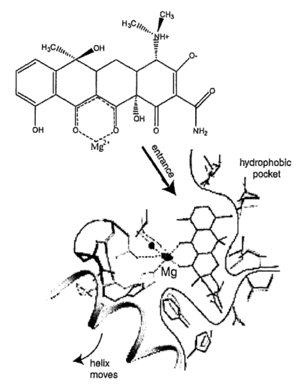
باستطاعة بروتين الغشاء الخارجي للإشريكية القولونية TolC (الشكل ٩.٦) أن يتفاعل مع العديد من مختلف إنزيمات نقل الموضع ترانسلوكازات (translocases) للغشاء الداخلي لتكوّن قنوات عبر كلا الغشائين لتنتج نفق من السيتوبلازم إلى البيئة الخارجية التي يمكن أن تجتاز بواسطة كل من الجزيئات الصغيرة والبروتينات الكبيرة التي تم تصديرها (انظر " آلية إفراز البروتين في الممرضات السالبة- لغرام وعلاقتها بالمرض": أسفل) (كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*, 2000). وهكذا فيعدُّ TolC النموذج لبروتين الغشاء الخارجي الشريك لمضخات تدفق السالبة-لغرام. وأظهر تحليل أشعة -إكس (كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*, 2000) للمثلوث (trimer) الوظيفي لكل من حقل ١٢- الخيطي بيتا- باريل (برميل- بيتا) (12-stranded β-barrel) (أربعة لكل موحود) وحقل ألفا -الحلزوني (α helical) (الشكل ٩.٦ اللوح الأيسر) المجاور لحقل باريل. وهناك جدل بأن الحقل بيتا باريل، النوعي لتراكيب مسام الغشاء الخارجي (كويبنيك وآخرون Koebnik *et al.*, 2000) يحد جزء الغشاء الخارجي ومن ثم الموضع الحلزوني ينتأ إلى داخل ومن خلال الجبلة ليكون تفاعلات، عن طريق تفاعلات ملف-ملف (coil-coil interactions) مع حقول الملف- الملفوف لزوج ترانسلوكاز الغشاء الداخلي، مثال، AcrAB. وبمجرد عزله، تغلق القناة في برميل ألفا-الحلزوني لـ TolC، كما يظهر في المنظر العلوي للشكل (٩.٦) (اللوحات اليمنى). ويفترض بأنه أثناء تدفق الجزيء الصغير والبروتين خلال هذه القناة، تتوسع القناة الداخلية بدوران اللفات الملفوفة، وفك التلولب التبايني التجسمي، المُحرِض بواسطة تفاعل البروتين-البروتين مع مكونات الغشاء الداخلي للمضخة (كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*,2000). يستطيع الشكل المفتوح أن ينتج قطر نفق في TolC (اللوح الأسفل) بمقدار 30 Å. وعندما ينفصل TolC مرة أخرى من شركائه في الغشاء الداخلي مثال AcrAB، فسوف يعود للحالة المغلقة ليتجنب تسرب المكونات الجبِلَية.



الشكل (٩.٦). (اليسار) التصميم الهندسي لـ TolC، (اليمين) نماذج لـ TolC في الحالات المفتوحة والمغلقة. (معدلة من كوروناكيس وآخرون Koronakis *et al.*, 2000)، بالإذن.

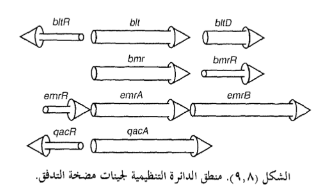
تنظيم مضخات التدفق

من أفضل مضخات تدفق المضاد الحيوي التي تمت دراستها ربما تكون مضخات التتراسيكلين، مع TetA-L التي ذكرت أعلاه كأعضاء عائلة MFS في كل من البكتيريا السالبة والموجبة–لغرام . وعندما يدخل التتراسيكلين مثل هذه الخلية البكتيرية، فإنه يرتبط بانجذاب عالٍ مع البروتين، TetR، الذي يعمل ككابت لجين مضخة Tet، *tetA* في الإشريكية القولونية. ويخلص معقد Tet·TetR الكبت السالب (negative repression) المرتاح لإظهار جين مضخة Tet. وتركيب TetR مع وبدون ربيطة التتراسيكلين، المرتبط مع Tet المشغل دنا أظهر أن الربط لمعقد ماغنيسيوم (Mg^{2+})-تتراسيكلين يجعل TetR يفقد الانجذاب لموقع دنا الخاص به (أورث وآخرون Orth *et al.*, 2000) (الشكل ٩،٧). يبلغ K_d لربط معقد الماغنيسيوم – والتتراسيكلين مع TetR حوالي 10^{-9} M، بعض ألف – طية أضيق من 10^{-6} للربط مع الريبوسوم 30S، وبذلك فالتخلص من الكبت الانتساخي لـ*tetA* يرتد عند مستويات منخفضة للدواء في الخلية البكتيريا. وعندما يرتبط Mg^{2+}- التتراسيكلين مع TetR، يهبط انجذابه ضد تيار دنا لـtetA ويقدر بحجم تسعة درجات (أورث وآخرون Orth *et al.*, 2000)، بواسطة الربيطة – المُحرضة، بحركة – تشبه عقرب الساعة لأحد اللفات الحلزية في TetR التي تبعد حقول ربط دنا.



الشكل (٩،٧). التركيب الأساسي للتخليص من الكبح لإنتساخ *tetA* عندما يرتبط الماغنيسيوم– التتراسيكلين مع TetR. (بالإذن من أورث وآخرون Orth *et al.*, 2000).

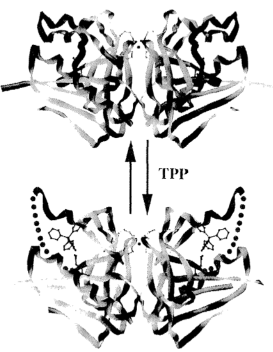
بعد ذلك يحدث فرط إنتاج بروتين المضخة 42-kDa TetA ، ويغرس داخل الغشاء السيتوبلازمي ، ويعمل في حالة ضد المنفذ مع دخول البروتونات لتضخ التتراسيكلين للخارج. وقد تكون مضخة تدفق Tet نشأت من مثل هذه المضخة في منتجي التتراسيكلين ، مثال ذلك تلك التي ترمز بواسطة جين *otrB* في المتسلسلة ريموسس (*Streptomyces rimosus*) (ماكموري وآخرون McMurry *et al.*, 1998). ويبدو أن منطق دائرة التنظيم هذا مُعمماً للمُشغِلين (operons) في الزائفة الزنجارية لجينات *MexM, MexB and oprM* ، والمحكم بواسطة الكابح *mexR* المستنسخ بشكل متباعد (متشعب)، لنظام جين *mtr* المقارن في النيسيرية السيلانية (الشكل ٩،٨)، وكذلك للمُشغَل *AcrF,E,S* في الإشريكية القولونية.



الشكل (٩،٨). منطق الدائرة التنظيمية لجينات مضخة التدفق.

وبالمثل فجين مضخة *bmr* في العصية الرقيقة هو تحت التحكم الانتساخي بواسطة جين *bmrR* ، الذي يُرمِز الكابح. ويعمل Bmr كمضخة تدفق للكاتيونات أليفة الدهن، مثال أيونات ترايميثيل فوسفونيوم (trimethylphosphonium ions) وكذلك للكوينولونات، الكلورامفينيكول، ودوكسوروبيسين (doxorubicin). ولقد تم حل تركيب أشعة –إكس للكابح BmrR ، الحر والمعقد مع ترايفينيل فوسفونيوم (triphenylphosphonium) (الشكل ٩،٩)، مشيراً بأن الربيطة أليفة الدهن تُحرض الكشف (التجلي) الانتقائي وإعادة تموضع الحلزون –ألفا. وهذا يكشف جيب ربط الداء الذي يتفاعل مع الربيطة بواسطة التراص الراهب للماء وبواسطة الاقتران الكهربائي الساكن (electrostatic pairing) مع أنيون غلوتامات كاربوكسيلات (glutamate carboxylate anion) المدفون (انظر الشكل ٤ و٥ في زيليزنوفا وآخرون Zheleznova *et al.*, 1999). يعتبر انتقال الحِلز إلى –اللفة وإعادة تعبئة الحقل الرابط BmrR متطلب لتمييز الانجذاب العالي. وقد استعمل بريننان وزملائه (Bernnan and colleagues) هذه الملاحظة للاقتراح بأن هذا المنطق ربما يُستعمل لربط وتمييز الدواء بواسطة بروتينات مضخة تدفق الغشاء، مثال ذلك Bmr (زيليزنوفا وآخرون Zheleznova *et al.*, 2000)، EmrA and B,QacA وغيرهم من عائلة MFS ، والعديد منها له غلوتامات محفوظ في الحقل عبر الغشاء، كما تفعل المضخات من عائلة SMR. ويقترحون بأن الأجزاء الراهبة للماء من المضادّات الحيوية تنقسم داخل الغشاء السيتوبلازمي عند الوريقة الداخلية. وإذا حدث لحقل ربط الربيطة لمضخة التدفق تغييرات تكوينية مؤقتة بواسطة

انتقالات الحِلز – إلى – اللفة، مع واحدة من التكوينات تكشف الغلوتامات المدفونة لترتبط بالربيطة، فسوف يجد المضاد الحيوي هذا الموقع بواسطة المواجهة الانتشارية ثنائية – الأبعاد (two-dimensional diffusional encounter).



الشكل (٩،٩). ربط الكاتيون أليف الدهن أيون ترايفينيل فوسفونيوم مع الكابح BmrR. (بالإذن من زيليزنوفا وآخرون Zheleznova *et al.*, 1999).

كيف يتعقد الدواء– والمضخة ثم يستشعر ΔpH عبر الغشاء ويطرد غير إتجاهياً المضاد الحيوي إلى الخارج في حالة انجذاب – منخفضة لا يزال يتعين تحليله.

يعتبر تنظيم جينات المسام والمضخة ذا أهمية إكلينيكية في معالجة عداوى الزائفة الزنجارية بالكاربابينيم (إيني وآخرون Enne *et al.*, 2001). وبإمكان طفرات النقطة (point mutations) في جين *mexR* أن تؤدي إلى أشكال طفرة MexR لهذا البروتين الكابح ذا الانجذاب المنخفض للأهداف المعززة، ليسمح بالتخلص من الكبح. وذلك طريق عام للتنظيم العالي لمُشغل *mexA- mexB-oprM* الذي ذكر سابقاً. ومضخة التدفق– ثلاثية المكونات، واسعة المدى هذه تتيح بوابة خروج الكوينولونات، التتراسيكلين، كلورامفينيكول، والبيتالاكتامات الطبيعية. ومن الكاربابينيمات الاثنين المصادق عليهما، الإميبينيم الذي يفتقر للسلاسل الجانبية أليفة الدهن، لا يتم تصديره. والميروبينيم، بسلسلته الجانبية الحلقية غير المتجانسة، يُضخ للخارج. وترتفع التراكيز الدنيا المثبطة (MICs) نموذجياً من ٠،١٢ –٠،٥ ملغم/ ليتر.

ومن ناحية أخرى، فاستعمال الإميبينيم ينتقي لطفرات الزائفة الزنجارية العديمة مسام الغشاء الخارجي OprD، وغياب ذلك المسام يحد من دخول الدواء، وترتفع قيم MICs للإميبينيم من ١ – ٢ ملغم / ليتر إلى ٨ – ٣٢

ملغم/ ليتر (إيني وآخرون Enne *et al.*, 2001). وللميروبينيم كذلك بعض العبور خلال OprD لأن التراكيز الدنيا المثبطة في السلالات في هذه الطفرات يرتفع بدرجة تصل إلى ٢ - ٤ ملغم/ليتر. ولاحظ ليفرمور Livermore, 2000 بأن هذه المشاهدات قد تفضل استخدام الميروبينيم؛ بسبب أن طفرتين اثنتين (*oprD* و *mexR*)، عند تضاعف قليل التردد، مطلوب لجعل قيم MIC للميروبينيم خارج النطاق المفيد. ولحظ الآلية الإضافية للبيتالاكتامازات المُعدنة والتي تعمل كإنزيمات كاربابينيمازات (carbapenemases) (الفصل الثامن) كمُحدد مقاومة إضافي.

انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي للإشريكية القولونية O157:H7

لقد ذكرنا مسبقاً في هذا الفصل وغيره في هذا الكتاب بأن بكتيريا معينة هي مُمْرضات أفضل من غيرها. تقوم البكتيريا الزائفة الزنجارية السالبة- لغرام بعمل جيد في المحافظة على تركيز المضاد الحيوي داخل الخلية منخفض بواسطة كل من تحريك العديد من مختلف مضخات التدفق، وكذلك بواسطة الحد من الامتصاص بواسطة إظهار بروتينات مسام الغشاء الخارجي، بورينات (porins) التي تحد من انتشار المضادّات الحيوية للداخل وغيرها من الجزيئات الصغيرة المضادة البكتيرية. وقد بينت الدراسات الحديثة (مارتينيز وآخرون Martinez *et al.*, 2001) بأن حاجز النفاذية الخارجي للسلالات الفوعية، السامة للإشريكية القولونية قد يكون أيضاً أكثر تقييداً لتخلل (لنفوذ) المضاد الحيوي. والإشريكية القولونية O157:H7 اكتشفت لأول مرة في ١٩٨٢م في اللحم البقري غير المطبوخ جيداً والتلوث- برازياً، الذي يسبب إلى نحو ٧٥,٠٠٠ حالة من العداوى سنوياً في الولايات المتحدة ، وفاشيات التهاب القولون الدموي التي يمكن أن تَتطوُر إلى المتلازمة البولية الحالة للدم (hemolytic uremic syndrome) (ميد وآخرون Mead *et at.*, 1999) (الشكل ٩.١٠).

تدخل سلالة O157:H7 خلال المعدة وتستعمر الخلايا الظهارية في الأمعاء، وتتكاثر وتنتج السم. وأحد مكونات السم يتفاعل مع الدهن السكري (غليكوليبيد) (glycolipid) للغشاء وغيره ومن ثم يدخل الخلايا ويعرقل البناء الحيوي للبروتين (انظر كابر وأوبراين Kaper and O'Brien, 1998، كارمالي Karmali, 1989). تظهر الإشريكية القولونية O157:H7 مقاومة للستربتوميسين، التتراسيكلين، وأدوية السلفا وربما تفعل ذلك من خلال التقليل من نفاذية الغشاء الخارجي للامتصاص. وستعمل مارتينيز وآخرون Martinez *et al.*, 2001، الفحص (المقايسة) الحركي للكشف عن نشاط الفوسفاتيز القلوي الجِبْلِي (periplasmic alkaline phosphatase) لحساب ذلك، مقارنة بالكونترول السلالات غير الفوعية، للإشريكية القولونية O157:H7 6- أضعاف أقل نفوذية للجزئ الصغير المادة الأنيونية وإنقاص ألف-ضعف لتحول العاثية (phage transformation). والتسلسل الحديث لجين الإشريكية القولونية O157:H7 (بيرنا وآخرون Perna *et al.*, 2001) قد أظهر أعداد صغيرة من التغييرات في المسامات الرئيسة OmpC، OmpF ضمن ١,٣٨٧ جينات من ٣,٥٠٠ التي تعتبر مختلفة (متميزة) وفي مجموعات جين -نوعي السلالة في هذه

السلالة الممرضة من الإشريكية القولونية. وبدون شك سيكون هناك العديد من العناصر المساهمة في سمية سلالة O157:H7، ذات ١٥ جزر جين تبلغ 15 kb< التي ترمز العناصر الفوعية المفترضة (بيرنا وآخرون*Perna et al.*, 2001)، ولكن فحص النفاذية قد يسمح بالبحث عن عوامل مضادّات حيوية ذات خواص امتصاص أفضل في هذه المُمْرضات.



الشكل (٩,١٠). مزرعة الإشريكية القولونية O157:H7.

آلية إفراز البروتين في المُمْرضات السالبة – لغرام وعلاقتها بالمرض

إضافة إلى الناقل – والتصدير المتواسط – بمضخة البروتين للجزيئات الصغيرة، ويشمل المضادّات الحيوية أليفة الدهن، فكل من البكتيريا المُمْرضة السالبة – لغرام والموجبة – لغرام تفرز بروتينات بواسطة آلية بروتين مخصصة (انظر لي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001، للمراجعة). وإفراز البروتين الغشاء الداخلي هو مشابه في البكتيريا السالبة – لغرام والموجبة – لغرام باستعمال آلية سبيل (طريق) Sec. وللكائنات الموجبة– لغرام يسمح هذا للبروتينات، مثل السموم الخارجية (exotoxins) (انظر الفصل الخامس عشر لجينات مختلف السموم الخارجية الموجودة في المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA))، العبور للوسط الخارجي بواسطة اجتياز شبكة الببتيدوغليكان. في الكائنات السالبة -لغرام، المرور عبر الغشاء الخارجي يشمل العديد من أنواع آليات تصدير البروتين المتخصصة، وتعرف بالنوع I-IV أنظمة الإفراز (type I-IV secretion systems)، وكذلك تجمع الأهداب (pili assembly) عبر الغشاء يشارك في ارتباط الإشريكية القولونية مع خلايا المضيف. وهذه معقدات جزيئية عالية (supramolecular complexes) التي يتم تجمعها في الغشية الداخلية والخارجية.

تبدأ مختلف البكتيريا المعوية المُمْرضة المرض بواسطة التعبير عن الالتصاق وفي بعض الأحيان البروتينات الغزوية على الأغشية الخارجية، التي تتجمع بواسطة أنظمة الإفراز المذكورة أدناه. والمُمْرضات الملتصقة ولكن غير الغزوية مثال الضمة الكوليرية *(Vibrio cholerae)* والإشريكية القولونية المعوية المُمْرضة *(enteropathogenic E.coli)* (EPEC) والإشريكية القولونية النزفية المعوية (enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC)) تصنع اتصالات بروتين– بروتين

(proetin-protein contacts) مع الخلايا الظهارية في الأمعاء الدقيقة ومن ثم تُشغل مسارات التأشير في خلايا المضيف التي تفعل قنوات أيونات الكلوريد لتدفق الكلوريد والماء لتحدث المتلازمات الإسهالية (نتارو وكابير Nataro and Kaper, 1998، برينتي وفينلاي Prente and Finlay, 2001). وتستطيع سلالات السالمونيلا والشيغيلة الزحارية *(Shigella dysenteriae)* تحريض الامتصاص (القبط) بواسطة الخلايا الظهارية (انظر الفصل الخامس عشر) والمرور الآحق إلى داخل المساحات الخارج الخلية، عبوراً بالحاجز الظهاري. وفي الحمى التيفية (typhoid fever) ينتج ذلك بكتيريا في الدم (تجرثم الدم وانسمام الدم) (bacteremia and septicemia)، في حين أن غزوات الشيغيلة تكون متمركزة في الغشاء المخاطي للقولوني والمستقيمي، مؤدياً إلى استجابات مدمرة والتهابية للأنسجة والزحار الُمميز (سانسونيتي وآخرون Sansonetti *et al.*, 2001).

للبروتين المكون – للمسام الحال للدم (the pore-forming hemolysin protein) (HlyA) للإشريكية القولونية المرضة للجهاز البولي التي تسبب ٨٠٪ من عداوى الجهاز البولي، تكرارات متعدِّدة (multuiple repeats) من تسلسلات ربط – الكالسيوم، وتُغرس في داخل الأغشية، وهي جزء من عائلة من السموم المتكررة (repeat toxins) (كووت Coote, 1992) التي تفرز بواسطة الماكينة (الآلية) من النوع I. وهناك ثلاثة منتجات جينات أخرى مطلوبة لإفراز HlyA. ويضيف HlyC مجموعات أسيل C_{14} أو C_{16} إلى اثنين من السلاسل الجانبية ليزين (lysine side chains) في HlyA لزيادة رهاب الماء. ويعدُّ HlyB و HlyD مكونات بروتين للغشاء الداخلي لماكينة الإفراز من النوع I و TolC المذكورة أعلاه في نظام تدفق Acr، البروتين الشريك للغشاء الخارجي الذي يسمح بإفراز HlyA خلال الغشاء الخارجي إلى الوسط الخارجي. ويعدُّ HlyA من نوع (ABC-type ATPase)، وربما له علاقة بالناقل MsbA المذكور أعلاه، ويربط إفراز البروتين النوع I إلى النوع -ABC نواقل المقاومة المتعدِّدة الدواء. و TolC هو حاجز غشاء خارجي ١٢– المجدول (الحبلي) (12-stranded) (كوروناكيز وآخرون Koronakis *et al.*, 2000) مع نهاية- C - ألفا –الحِلزية التي تملأ القناة الداخلية في حالة السكون لتمنع تسرب المكونات الجبلَية. ويفترض بأن القناة تفتح إلى كامل قطرها nm– 3.4 عندما تتعقد مع شركاء الإفراز من النوع I.

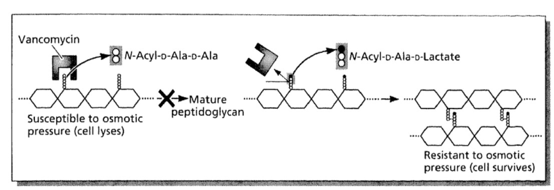
وتعرف ماكينة الإفراز من النوع II كذلك بالمسار الإفرازي العام (general secretory pathway) (ليي وتشنيوود Lee and Schneewind, 2001) وهو مسئول عن تصدير بعض السموم البكتيرية مثل سم الكوليرا، السم المعوي للإشريكية القولونية، وسم شيغا (shiga toxin) للشيغيلة الزحارية، وسم الإشريكية القولونية الشبيهة– بسموم شيغا (shiga-like toxins) (مثال، في السلالات O157:H7)، وجميعها لها تراكيب AB_5 منقوصة (oligmeric)، حيث الوحدة الفرعية A تنشط إنزيمياً عندما يتم أخذها بواسطة خلايا المضيف. والمكونات الخماسية B_5 تتجمع ذاتياً في غشاء المضيف وتستطيع أن تميز الدهون السكرية (glycolipids) المختلفة، جلوبوسيد (globoside Gb3) للسم للإشريكية القولونية السامة للأمعاء – المشابه – لشيغا (ETEC) وغانغليوسيد (ganglioside GM1) لسم الكوليرا (الضمة). وبعد ذلك تتفرق مكونات A وتنضوي بواسطة خلية المضيف، حيث تنفذ بعض الخطوة الإنزيمية. كما

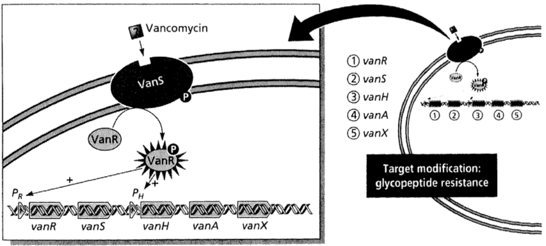
أن سم شيغا للشيغيلة والإشريكية القولونية O157:H7 هو N- غليكوسيداز (N-glycosidase) نوعي ينقي فضالة معينة في 23S rRNA وبذلك يعرقل البناء الحيوي للبروتين، في حين أن الوحدة الفرعية A التابعة لـ ETEC وسم الكوليرا من الضمة الكوليرية يؤديان إلى رفع AMP الحلقي وGMP الحلقي (cyclic AMP and cyclic GMP)، تنشيط قنوات أيون الكلوريد، والناتج الإسهالات (جرويسمان Groisman, 2001).

ويفرز كذلك الإنزيمات الخارجية بواسطة مسار II، وتشمل بروتيازات (الإنزيمات البروتينية) (proteases)، إيلاستاز (elastase) (إنزيم مرونة النسيج)، فوسفاتازات (phosphatases)، وبيكتيت ليسازات (pectate lysases) (الإنزيمات الحالة للبكتيت) بواسطة مُمْرضات النبات هذه مثل إروينيا كاروتوفورا *(Erwinia carotovora)*. وتوجد بقدر ١٢ بروتينات غشاء داخلي في ماكنة الإفراز هذا (روسل Russel,1998). ويعرف كذلك الـ ATPase عند الوجه السيتوبلازمي للغشاء الداخلي، تشابيرون الجِبْلِّي (periplasmic chaperone)، GspS، وبروتين غشاء خارجي آخر، GspD بالسكريتين (secretin).

وتزامر السكريتين تناقصياً (oligomerizes) إلى حلقة دوديكاميريك (dodecameric ring) مع قطر داخلي يبلغ 7.6nm (نووين وآخرون Nouwen *et al.*, 1999) الذي يعتقد بأن يكون القناة لمرور البروتين خلال الغشاء الخارجي.

أما الماكينة من النوع III فلها أهمية خاصة لدورها المركزي في الفوعية والإمراضية لعداوى اليرسينية *(Yersinia)* والإشريكية القولونية ولغزو السالمونيلا والشيغيلة إلى داخل خلايا المضيف (انظر ليي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001، للمراجعة). ولقد تم شرح هذا الموضوع أكثر في الفصل الخامس عشر. ويفترض بأن الإفراز للبروتين من النوع III يحرض بواسطة الاحتكاك الفيزيائي (الطبيعي) بين البكتيريا وخلايا المضيف، على سبيل المثال، بواسطة تدرجات أيونية نوعية (specific ion gradients)، وتفيد بأنها تحقن البروتينات البكتيرية مباشرة إلى داخل سيتوبلازم خلايا الحيوان والإنسان. والتعطيل لأيض خلايا المضيف الناتج بإمكانه أن يؤدي إلى الدخول البكتيري (إلى الخلايا الظهارية بواسطة السالمونيلا)، إبطال قتل خلايا البلعمة الكبيرة (macrophage) (بواسطة اليريسنية الطاعونية *(Yersinia pestis)* الخارجية الخلوية)، أو تدمير الخلية (الخلايا الظهارية بواسطة EPEC). ومكونات بروتين الغشاء النوع III مشابهة للمكونات في تجميع السياط (flagella) وكذلك تبنى حول دوديكامر السكريتين (secretin dodecamer) في الغشاء الخارجي وبروتين الإبرة (الحبك) (needle protein) (SctF) الذي ينمو من السكريتين ويدخل غشاء خلية المضيف. والبروتينات التي تم إفرازها، وتشمل ١٤ بروتينات يرسينية خارجية (Yops)، تمر خلال قناة السيكريتين والإبرة إلى داخل الخلية مباشرة. وتعطي إشارة تمييز المادة لتحدد أي من البروتينات البكتيرية مُدمغة (مُعلَّمة) للإفراز من النوع III التي لم حل شفرتها (انظر ليي وتشينوويند Lee, and Schneewind, 2001). وتقل عدوائية اليرسينية الطاعونية لتسبب الطاعون بشكل مثير عندما يعرقل إفراز النوع III، وهكذا فهذه الماكينة سوف تكون هدف جيد لتقليل الإمراضية في العداوى السالبة – لغرام.





مقاومة المضاد الحيوي بواسطة تعديل الهدف

الفصل العاشر

مقاومة المضاد الحيوي بواسطة تبديل أو تعديل هدف المضاد الحيوي

ANTIBIOTIC RESISTANCE BY REPLACEMENT OR MODIFICATION OF THE ANTIBIOTIC TARGET

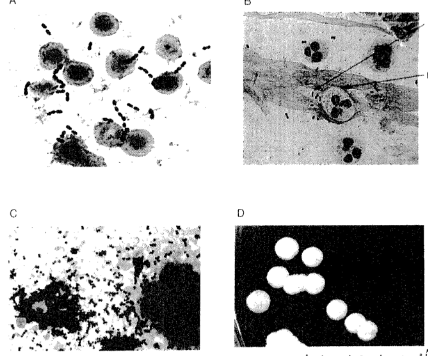
الطرق الثلاث الأخيرة التي تؤدي إلى المقاومة السريرية المهمة في البكتيريا المُمْرِضة هي قدرة المُمْرِضات المقاومة- للدواء على تعديل الدواء المستهدف إلى عدم الحساسية في حين المحافظة على وظيفته الخلوية الرئيسة. الصورة في مقدمة الفصل هي عصف من القسم للشكل (٢،٢) التي يشرح المبادئ لمقاومة المضاد الحيوي التي تنشأ من تبديل أو تعديل الهدف إلى الشكل غير الحساس.

وبالإمكان تحقيق ذلك بواسطة الطفرة عند واحد أو أكثر من المواقع في الجين المستهدف أو بواسطة استيراد الجين التي يخصص إنزيم تبديل جديد الذي يملك حساسية منخفضة واضحة للدواء. تمثل مقاومة البيتالاكتام في سلالات المكورة العقدية الرئوية والمكورة العنقودية الذهبية الموجبة -لغرام هذين الاختلافين في الموضوع. ولكل من الإريثروميسين من عائلة الميكروليدات وعائلة ستربتوجرامين B الجذاب ناقص في الاستجابة ميثلة (methylation) أدينين واحد في 23S rRNA في الوحدة الفرعية الريبوسومية 50S. وأخيراً سوف نلاحظ بأن إعادة برمجة جدار الخلية في مقاومة المكورة المعوية المقاومة -للفانكوميسين الأنماط الظاهرية (VRE)، A,B و C. الرسومات البيانية الدقيقة للمكورة العنقودية الذهبية، المكورة العقدية الرئوية والمكورة المعوية البرازية تظهر في الشكل (١٠،١).

مقاومة المثسيلين في المكورة العنقودية الذهبية

أُدخل المثسيلين (الشكل ١٠،٢)، مع ٢،٥ -دايميثوكسي بنزويل (2,5-dimethoxybenzoyl) الضخم المستبدل على هيكل ٦- أمينوبنسيلّين (6-aminopencillin)، في ١٩٥٠م لمعالجة العداوى البكتيرية الموجبة -لغرام التي أصبحت مقاومة للبنسيلّين بواسطة التحلل المائي للبيتالاكتاماز المحرض للمضاد الحيوي. والسلسلة الجانبية الضخمة المستبدلة في وسيط إنزيم بنسيلويل - O- لكتاميزأسيل (pencilloyl-*O*-lactamase acyl) يبطئ انتقائياً خطوة نزع الأسيل الحالة المائية (deacylation hydrolytic step) (انظر الفصل الثامن) ويطيل العمر الزمني لإنزيم أسيل التساهمي، ويبطل نشاط البيتا لكتاميز بشكل فعال أثناء تلك الفترة. وكانت هذه الإستراتيجية فعالة لعشر سنوات قبل تَطوُّر

فاشيات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA) في أوروبا في ١٩٦١م، وبحلول الثمانينيات كانت MRSA قد انتشرت عالمياً. ولا تنتج MRSA نسخة محسنة من بيتالاكتاماز التي تعدُّ أكثر فعاليّة عند مضغ المثسيلين، ولكن على العكس فقد اكتسبت جين *mecA*، الذي يرمز بروتين مرتبط- بالبنسيلّين جديد (PBP)، يسمى PBP2A (وكذلك 'PBP2)، في أكثر من ٩٠٪ من العزل السريري المقاوم –للدواء (انظر هيرماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001). وفي بيئة المستشفى في الولايات المتحدة وقد يصل معدل حدوث (incidence) MRSA إلى ٢٠-٤٠ ٪، وفي تقرير في اليابان وصل معدل الحدوث إلى حد ٦٠٪ (تشو وآخرون Shaw *et al.*, 1996). وبإمكان MRSA أن تكون سائدة بالأخص في مراكز الحروق، ولكنها توجد أيضاً في دور الرعاية الطويلة الأمد الأخرى. MRSA تواجه مشكلات للمعالجة؛ بسبب أنها مقاومة لجزيئات بيتا لكتام الرئيسة، وتشمل البنسيلّينات، كيفالوسبورينات، وبينيمات. وعدم الحساسية العامة- للبيتالاكتام تنسب إلى انجذاب الربط المنخفض لـ PBP2A المرمز بـ*mecA*، 76-kDa ترانسغليكوسيلاز/ ببتيدترانسبيتيداز الثنائي الوظيفة. وعلى النقيض، فالـ PBPs الطبيعية عالية–الوزن–الجزيئي، PBP1 خلال ٤، ربما تظل حساسة للأسلة بواسطة بيتالاكتامات في المكورة العنقودية الذهبية الحساسة للمثسيلين (MSSA).



الشكل (١٠,١). المُمْرِضات الموجبة–لغرام التي أصبحت مقاومة للدواء بواسطة تغيير الدواء: (A) المكورة المعوية البرازية في مزرعة الدم، (B) المكورة العقدية الرئوية المحفظة (encapsulated)، وتشمل (1) المكورات المزدوجة الموجبة–لغرام المحاطة بمحفظة و(2) الكرية البيضاء متعدِّدة الأشكال مفصصة النوى (polymorphonuclear leukocyte) ذات النواة متعدِّدة الفصوص، (C) صبغة غرام لبلغم مريض مصاب بالتهاب رئوي بالمكورة العنقودية الذهبية، (D) مستعمرات المكورة العنقودية "الذهبية" على طبق إيغار الدم. (من إليوت وآخرون (١٩٩٧م)، بالإذن).

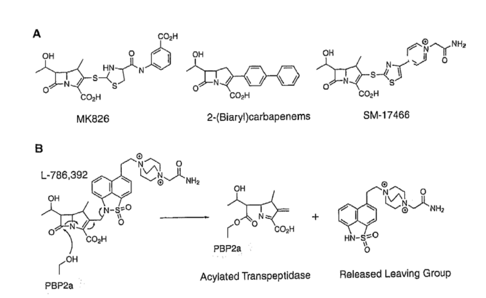
Methicillin

الشكل (١٠,٢). تركيب المثسيلين.

الأساس الجزيئي لعدم حساسية PBP2A للاكتامات في حين أنها ما تزال تقوم بوظائف الربط - التبادلي للببتيدببتيدوغليكان (PG) ليس واضحاً بعد وربما سيتطلب مقارنة تركيب أشعة-إكس مع PBPs الحساس لنفس الكائن. ومصدر جين *mecA* غير معروف كذلك، على الرغم من افتراض الانتقال الأفقي من بعض أنواع المكورات الأخرى (الفصل السابع). ومن المعروف بأن النمط الظاهري لـ MRSA نشأ من انتقال عنصر دنا المتحرك 30-40 kb مع ثلاثي الجينات *mecR1-mecI-mecA* عند لب النمط الظاهري المحرض- للمثسيلين. ولاحظنا في الفصل الثامن (الشكل ٨,١٢) قرب موازاة المنطق لدائرة *blaRI-blaI-blaZ*، وفي تلك الحالة لتحريض البيتالاكتاماز، لدائرة *mecR1-mecI-mecA* للنمط الظاهري لـ MRSA (بواسطة الشلال المنشط ذا المكونات -الاثنين من الجين الحال للبروتين) (a proteolytic two-component gene activating cascade). ويعدُّ بروتين 68-kDa MecR1 مستشعر/ محول طاقيّ (transducer) عبر الغشاء، مع الحقل الخارجي إكسو PBP (exo PBP) كلاسيكي الذي يمكن أسّلته بواسطة المثسيلين، وهذا الاحتلال التساهمي يحول (transduced) للحقل الداخلي (endo domain)، زنك بروتياز زيموجين (zin protease zymogen) الذي يخضع لتحلل ذاتي للبروتين (autoproteolysis). الجزء MecR1 السيتوبلازمي المنطلق، الذي هو بروتياز فعّال الآن، بعد ذلك يفلق الكابت MecI بحيث إنه لا يستطيع أن يتزامر مثنوياً (dimerize) ويرتبط بالـ دنا. يرتاح كبح الانتساخ لجين *mecA* ويصنع بروتين PBP2A، وينقل لسطح الخلية ويوظف غير متلف للربط -التساهمي للببتيدوغليكان في وجود المثسيلين الخارج الخلية وغيره من مضادّات اللاكتام الحيوية. ومورفولوجي (علم التشكل) ببتيدوغليكان الذي تم تصنيعه بواسطة PBP2A في غياب PBPs الوظيفية الأخرى يتغير بعض الشيء ولكنه كاف بشكل واضح ليسمح بنمو MRSA. وتوجد جينات مساعدة في MRSA، جينات *fem* التي تضيف جسور غليسيل الخماسي (pentaglycyl) العابرة إلى خيوط ببتيدوغليكان قبل الربط- العبري، الذي سوف يساهم في النمط الظاهري (بيرجر-باتشي و تسشيرسكي Berger-Bachi and Tschierske, 1998، فيليب وآخرون Filipe *et al.*, 2000، تشولار وبرات Scholar and Pratt, 2000). ولقد تم تقديرعدد جزيئات PBP خلية MSSA ونفس الخلية التي تحولت إلى النمط الظاهري لـ MRSA مع *mec* DNA (بوسي ودوجيرتي Pucci and Dougherty, 2002). ولخلية MSSA حوالي ١,١٠٠ نسخة من PBPs (PBP1-4) ويبلغ PBP2 حوالي ٤٥٪ من المجموع. ولخلية MRSA حوالي ١,٩٠٠ إلى ٢,٠٠٠ PBPs لكل خلية، ويشكل PBP2A ٤٠٪ و PBP2 ٢٥٪ من المجموع.

الفعاليّة الطبية الكيميائية المكثفة لإنتاج اللاكتامات سوف تستهدف PBP2A وتعكس النمط الظاهري MRSA إلى MSSA قد أدت إلى بعض تراكيب اللاكتام الجديدة ذات الفعاليّة الواعدة. الأمثلة في سلسلة الكاربابينيم ظهرت في الشكل (١٠,٣ A)، مع بدائل ٢ – أريل (2-aryl) أو ٢ – كاربولينيل (2- carbolinyl)، إضافة إلى بيتا–ميثيل المستبدل أريل كاربابينيم MK-826 (تشو وآخرون ١٩٩٦، ليي وهيكر Lee and Hecker,1999). ولـ MK-826 خواص حركيات دواء (pharmacokinetic) التي تقترح جرعة –واحدة يومياً. واحد الكاربابينيم تم تصميمه عند ميرك (Merck) ليكون فعال ضد MRSA بخاصية السلسلة الجانبية أليفة الدهن الكبيرة. ولوحظ أن البدائل الراهبة للماء الكبيرة هذه كانت مستضدية (antigenic) وسببت فرط الحساسية (hypersensitivity)، على حد قول روزين وآخرون Rosen *et al.*, 1999، إبتكر الكاربابينيم L-786, 392 الذي عند المهاجمة بواسطة الموقع النشط– سيرين لـ PBP2A، يخضع إلى تجزيء كيميائي وطرد سلسلة الجانبية المستضدة للتقليل من المناعة الوراثية (الشكل ١٠,٣ B) (روزين وآخرون Rosen et al., 1999).

وبإمكان مثل هذه الجزيئات أن تشبع الحاجة الإكلينيكية الملحة؛ بسبب أن العزل السريري قد اكتسب محددات مقاومة دواء أخرى من الجهود المبذولة لمعالجته بواسطة مختلف المضادّات الحيوية. وعلى سبيل المثال، ثلثي العزل السريري لـ MRSA في اليابان في ١٩٩٢م له مقاومة دواء إضافية (تشو وآخرون Chu *et al.*, 1996). وبإمكان الانتقاء لمقاومة إضافية أن تحدث بسرعة. وبعد الانتشار الواسع لاستعمال الفلوروكوينولون السبروفلوكساسين لمعاجة عداوى MRSA، ارتفع معدل حدوث المقاومة المجتمعة لـ MRSA والكوينولون من ٥٪ إلى> ٨٥٪ في خلال سنة.



الشكل (١٠,٣). الكاربابينيمات ذات الفعاليّة ضد MRSA: (A) الجزيئات ببدائل أريل السلسلة الجانبية، (B) إطلاق السلسلة الجانبية المولدة المناعة للكاربابينيم L-786,392 على هجوم بيتالاكتام بواسطة الموقع – النشط سيرين لــ PBP2A.

المكورة العقدية الرئوية المقاومة للبيتا لكتام

تعدُّ المكورة العقدية الرئوية عامل مسبب مهم في الالتهاب الرئوي المكتسب من –المجتمع ، التهاب السحايا ، التهاب الأذن الوسطى ، والتهاب الجيوب. وبخلاف سلالات المكورة العنقودية الذهبية وغيرها العديد من المرضات ، المكورة العقدية الرئوية لا تستخدم بيتا لكتامازات كطريق أساسي لمقاومة البنسيلّين. ومن ناحية أخرى ، ارتفعت مقاومة البنسيلّين ٢٤٠- طية لأكثر من خمسة عقود من ١٩٤١-١٩٩١م (انظر تشو وآخرون Chu *et al*., 1996) بسبب تَطوُّر المقاومة في الأهداف PBP نفسها. والفاشية الأولية للمكورة العقدية الرئوية في جنوب إفريقيا في ١٩٧٧م قد انتشرت في معظم أنحاء العالم (تشو وآخرون Chu *et al*., 1996). ولقد اظهر تحليل ببتيدترانسببتيدازات / ترانسغليكوسيلازات في المكورة العقدية الرئوية خمسة PBPs ذات الوزن –الجزيء –العالي التي ساهمت في القتل بواسطة البيتا لاكتامات : PBP1A, 1B, 2A, 2B and 2X. وPBP3 بالوزن –الجزيء- المنخفض ليس هدف قتل ، في حين أن PBP2B و2X يعتبران أساسيين. وتشمل المقاومة –منخفضة –المستوى للبنسيلّين PBP2X بينما الكيفالوسبورينات تظهر PBP2B ذا الانجذاب المنخفض ، وهؤلاء هم مقدمة لتغييرات إضافية في أنماط المقاومة- العالية. وتوجد طفرات في العزل السريري المقاومة للبيتا لكتام في جميع PBPs الخمس بالتوازن –الجزيء-العالي التي سببت انجذابات منخفضة للبيتالاكتمازات (ناجاي وآخرون Nagai *et al*., 2002). وهذا الاكتساب لخمس أنواع من البروتينات الطافرة يبدو أن له احتمالية منخفضة جداً إذا تطلب كل منها طفرة مستقلة . وهناك دليل على أنه على الأقل PBP2B و2X قد خضعوا لتأشب (recombination) مماثل في أجزاء مختلفة للجينات المشفرة لإيجاد جينات فوسيفسائية (mosaic genes) حيث تطوّرت المقاومة بواسطة آلية الكاسيت (cassette mechanism) (هاكينبيك Hakenbeck, 1998 ، سبرات Spratt, 1994). وهذا سوف يمثل خلط جين طبيعي وقد يسرع نشوء بروتينات PBP مقاومة –فوسيفسائية.

وقد أخبر عن تركيب أشعة- إكس للشكل الذائب من PBP2X (باريس وآخرون Pares *et al*., 1996) بعد بتر نهاية –N (N-terminal) لمرساة الغشاء ، لتظهر تركيب ثلاثة –حقول ، مع حقل ببتيدترانسببتيداز بين أمينو (amino) وحقل نهاية — كربوكسي (carboyy). ولقد تم تحديد تسلسل جين *pbp2x* من ٣٥ عزل سريري من المكورة العقدية الرئوية المقاومة للبنسيلّين (أساهي وآخرون Asahi *et al*., 1999) وعُين على تركيب أشعة – إكس لحقل ببتيدترانسببتيداز ، مما يعكس تجمعات لتبديلات السلسلة الجانبية في موقع ربط البنسيلّين. والطبيعة النموذجية لهذه البروتينات قد تسهل خطة خلط الجينات لتوليد التنوع وتتيح الطريق لنشوء المقاومة. وباختصار ، فالميزة الأبرز في مقاومة المكورة العقدية الرئوية للبنسيلّين هي العدد الكبير من أهداف PBP التي تم تعديلها لعدم الحساسية لإظهار النمط الظاهري (هاكينبيك و آخرون Hakenbeck *et al*., 1999). يعكس هذا اللدونة (المرونة) (plasticity) الجينية السريعة والرائعة للبكتيريا عندما تواجه خطر الإخماد بواسطة المضاد الحيوي.

مقاومة الميكروليدات بواسطة أمثلة 23S rRNA

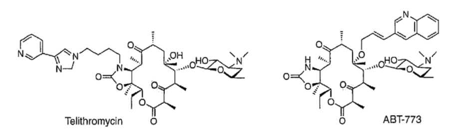
المضادّات الحيوية من صنف الميكروليد، وتشمل إريثروميسين والعوامل ممتدة –المدى أزيثروميسين وكلاريثروميسين (azithromycin and clarithromycin)، قد استعملت على نطاق واسع في عداوى الجهاز التنفسي، ولكن مقاومة الإريثروميسين قد أصبحت إشكالية. العزل السريري المكوراتي الرئوي (pneumococcal) هو مقاوم بشكل كبير للإريثروميسين، وفي دراسة واحدة في إفريقيا الجنوبية في ١٩٩١م، كان ٧٠٪ من عزل MRSA مقاوم للإريثروميسين (تشو وآخرون Chu *et al.*,1996). والطريق الرئيس للمقاومة هو تعديل 23S rRNA في الوحدة الفرعية الريبوسومية 50S لتصبح غير حساسة، في حين أن التدفق، كما لوحظ في الفصل التاسع، يمكن أن يكون معتداً كذلك.

تحديد أشعة– إكس الحديث للوحدة الفرعية 50S للريبوسوم المنقوعة بالإريثروميسين (الشكل ٤,٥) صوّر المضاد الحيوي مرتبط في تجويف ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) (peptidyltransferase cavity)، على مقربة من كلا الحلقات A (العقد) (A Loops) والحلقات P وبجانب A_{2058} (انظر الفصلين الرابع والسابع). وهو أحادي المثيلة الأحادية (monomethylation) أو المثيلة الثنائية (dimethylation) لمجموعة أمينو N_6 الحلقية الخارجية (N_6 exocyclic amino group) من A_{2058} (الشكل ٧,٦) بواسطة تعديل إنزيم ميثلة الريبوسوم بالإريثروميسين (Erm) الذي ينتج النمط الظاهري Erm وتخفيض انجذاب رنا للمضاد الحيوي، بدون التأثير على دور أو وظيفة A_{2058} في البناء الهندسي لببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل). المادة المشاركة هي المانح للميثيل العام البيولوجي إس– أدينوسيل مثيونين (*S*-adenosylmethionine)، لكل من إن –المثيلة (N-methylation) الأولى والثانية. وهناك العديد من إن– ميثيل ترانسفيرازات (N- methyltransferases) المعروفة، وتشمل رنا –ن– ميثيل ترانسفيراز RNA –N-methyltransferases ونشوء Erm ميثيل تراسفيرازات من هذه السلائف هو محتمل. وبالأخص، واحد مثل Erm، ErmE، هو إنزيم تركيبي فعال في منتج الإريثروميسين سكاروبولسبورا إريثري *(Saccharopolyspora erythraea)*، حيث إنه يوفر مناعة ذاتية لمنتج المضاد الحيوي (الفصل السابع) وربما يكون السلف الحديث لـ Erm في الممرضات المقاومة. وقد تم وصف أكثر من درزينتين من إنزيمات Erm في البكتيريا المقاومة ووصف تركيب أشعة– إكس لـ ErmX (بوسيير وآخرون Bussiere *et al.*, 1998).

التعديل الإنزيمي النوعي– ميثيل –A_{2058} في 23S RNA لا يقلل الانجذاب لمضادّات الميكروليد الحيوية من صنف الإريثروميسين فقط، ولكن أيضاً لتلك من صنف لينكوميسين/كلنداميسين، فضلاً عن مجموعة ثالثة، عائلة ستربتوجرامين B (بريستيناميسين)، وقد وصفت هذه بالنمط الظاهري ميكروليد– ليمكوساميد–ستربتوجرامين B (MLS_B) لمقاومة الدواء الريبوسومي (انظر الفصل الرابع، الشكل ٤,٥). وبينما إنزيم ErmE في *S.erythraea* ينتج تركيبياً (بنيويا)، فعادة النمط الظاهري MLS_B محرض بواسطة الإريثروميسين في الممرضات المقاومة. ولقد تمت دراسة انتساخ جين *ermC* جيداً في المكورة العنقودية الذهبية (تشو وآخرون Chu *et al.*,1996) ودلت على أن 141-bp التسلسل القائد (leader sequence) مباشرة ضد تيار شفرة البدء *ermC* يتبنى تركيب ثانوي الذي يفصل موقع ربط

الريبوسوم وبذلك يعرقل انتساخ *ermC*. وفي وجود مستويات منخفضة من الإريثروميسين، بواسطة آليات غير واضحة إلى الآن، يفترض بأن التركيب الثانوي للقائد يعاد طيه، ليكشف موقع ربط الريبوسوم، وليسمح بانتساخ *ermC*، وينتج ErmC ميثيل تراسنيفيريز، الذي يؤمثل (methylates) A_{2058} ويحمي الريبوسوم قبل أن تتراكم التراكيز القاتلة من الإريثروميسين في الخلية.

أحد أهداف الكيمياء الطبية في تطويرأنواع الإريثروميسين واسعة – المدى هو التغلب على الأنماط الظاهرية Erm بواسطة إيجاد نسخ شبة اصطناعية أو متبدلة من الميكروليدات التي لا تزال ترتبط مع نسخ A_{2058} المؤمثلة من 23S rRNA. التعديلات في الدواء الواسع – المدى كلاريثروميسين تشمل أكسدة ٣– هيدروكسي إلى مجموعة ٣– أوكسو، وتنتج سلسلة الكيتوليد (الشكل ١٠،٤)، التي تعدُّ فعالة ضد المكورة العقدية الرئوية المقاومة للإريثروميسين مثلما أنها لا تحرض النمط الظاهري MLS_B (تشو وآخرون Chu *et al.*,1996). التعديلات الإضافية في الجانب– الأيمن لهيكل الماكرولاكتون وربط بدائل الأريل (aryl substituents) تتيح انجذاب كافي لوحدات الريبوسوم الفرعية 50S المؤمثلة لتجعل الكيتوليدز أدوية جديدة واعدة. ولقد تمت المصادقة على تليثروميسين حديثاً للاستعمال البشري و ABT-773 في مرحلة متقدمة من التقييم السريري.

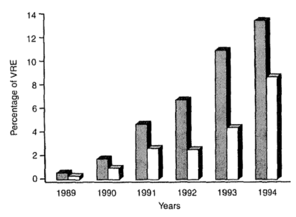


الشكل (١٠،٤). تركيب ٣–كيتوليدات (3-ketolides) تيليثروميسين و ABT-773، مشتقات الإريثروميسين واسعة–المدى.

إعادة برمجة VRE لنهايات ببتيدوغليكان

الاستعمال المتزايد للفانكوميسين لمعالجة العداوى التي تسببها MRSA الموجبة –لغرام في الثمانينيات والتسعينيات انتقت للمكورات المعوية المقاومة –للدواء، المُمْرضات الأقل قوة من المكورات العنقودية ولكنها انتهازية في المكان الذي تم إخلائه بواسطة البكتيريا الأخرى وفي المرضى المصابين بأجهزة مناعة ضعيفة. وأنواع المكورة المعوية البرازية *(E.faecalis)* مسئولة عن حوالي ٩٠ إلى ٩٥ ٪ من العزل السريري المقاوم –للفانكوميسين وتسبب المكورة المعوية فيسيم *(E.faecium)* ٥ ٪ أخرى مع أنواع صغرى مسئولة عن البقية. تعدُّ المكورات المعوية المسببات الرئيسة لالتهاب شغاف القلب (endocarditis) وهي مُمرضات شائعة في المرضى بالقثاطر المستقرة (indwelling catheters) وتشمل مرضى الديلزة (dialysis) والذين يجرون معالجة كيماوية الذين يعانون من نضوب الخلايا البيضاء –المحرض بالمعالجة الكيماوية في منتصف دورة المعالجة (موراي Murray, 2000). يُظهر الشكل (١٠،٥) ارتفاع في معدل حدوث VRE

من أقل من ٠.٥٪ في ١٩٨٩م إلى ٢٦٪ في ١٩٩٤م في أجنحة المستشفى ووحدات العناية الفائقة، حيث بإمكان المكورات المعوية أن تلوث وتتضاعف في الجروح الجراحية (انظر بول Poole, 2001، والمراجع فيه). ولقد كان هناك القليل من الاختيارات العلاجية لمعالجة VRE، ولكن المصادقة الحديثة لكل من توليفة سينيرسيد واوكسازوليدينون لينيزوليد (Synercid combination and the oxazolidinone linezolid) (الفصل الرابع) قد أتت ببدلائل الفعاليّة ضد VRE.



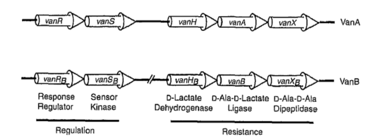
الشكل (١٠,٥). معدل حدوث VRE في وحدات العناية الفائقة (الخطوط المظللة) في أوائل التسعينيات (بالإذن من هيوز وتينوفر Hughes and Tenover, 1997).

النمط الظاهري الرئيس الأول لـ VRE كان يسمى VanA، تلاه النوع VanB وثيق الصلة، الذي له في الأساس نفس الآلية الجزيئية ولكن يختلف في الحساسية المستمرة للتيكوبلانين (الجدول ١٠,١) (انظر الشكل ٧,٨ لتركيب التيكوبلانين). ولقد تم العثور على النمط الظاهري لـ VanC في المكورة المعوية جالينارم *(Enterococcus galinarum)*، وقد تم وصف هذه التغييرات للأنماط الثلاث اللاحقة (سيتينكايا وآخرون Cetinkaya *et al.*, 2000).

الجدول (١٠,١). الأنماط الظاهرية للمكورات المعوية المقاومة – للغليكوببتيد.

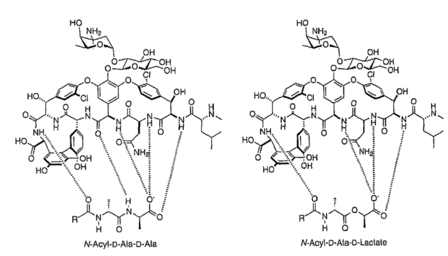
النمط الظاهري	عينة الأنواع	(MIC) ملغم/ فانكوميسين	لتر تيكوبلانين	المقاومة القابلة للإنتقال	التحريض
VanA	*المكورة المعوية فيسيم*	64->1,000	16-512	نعم	نعم
	المكورة المعوية البرازية				
	المكورة المعوية أفيم				
	المكورة المعوية جالينارم				
VanB	المكورة المعوية فيسيم	4-1,024	0.25-2	نعم	نعم
	المكورة المعوية البرازية				
VanC	المكورة المعوية جالينارم	2-32	0.12-2	لا	البعض
	المكورة المعوية كاسيلفلافس				

الأنماط الظاهرية VanA وVanB هي متولدة من البلاسميد وغالباً ما توجد الجينات ذات العلاقة على العناصر القابلة للانتقال المسئولة المسبِّبة لانتشارها السريع خلال الجمهرة المكوراتية المعوية. وقد وجد أن خمسة جينات منسقة ترادفياً هي ضرورية وكافية لكلتا النمطين الظاهريين VanA وVanB (الشكل ١٠,٦)، مع ثلاثة إنزيمات، VanH,VanA, VanX، لها دور في إعادة برمجة نهايات الببتيدوغليكان من *N*-acyl-D-Ala-D-Ala إلى *N*-acyl-D-Ala-D-lactate (الشكل ١٠,٧)، واثنان من البروتينات، VanS و VanR، تتكون من زوجين من العناصر التنظيمية التي تعتبر استشعار ومنظم استجابة لإعادة البرمجة المحرضة لمقاومة الفانكوميسين. والتحويل من د- د- ثنائي الببتيد (D,D-dipeptide) إلى د- د- ديبسي ببتيد (D-D-depsipeptide) في الترابط –غير المتقاطع لنهاية ببتيدوغليكان يؤثر ألف- أضعاف على النقصان في الربط الثابت للفانكوميسين (بج وآخرون Bugg *et al*., 1991) ويعكس ألف- أضعاف في الزيادة في MICs للفانكوميسين المشاهدة في VRE (الشكل ١٠,٨). وفقد الانجذاب هو في جزء كبير؛ بسبب فقد رابطة الهيدروجين الوسطى من كربونيل الببتيد (peptide carbonyl) على الجانب السفلي لجزيء الفانكوميسين على شكل-كأس نحو الأميد N-H للنهاية D-Ala-D-Ala جنباً إلى جنب مع تنافرات الحالة الأساسية بين إلكترونات الزوج الوحيد ديبسي ببتيد على إستر أكسجين D-Ala-D-Lac.



الشكل (١٠,٦). مجموعة – خمس جينات ضرورية وكافية لتضفي الأنماط الظاهرية VanA وVanB لـ VRE.

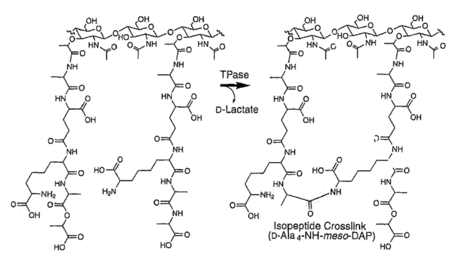
الشكل (١٠,٧). إعادة برمجة نهايات PG من D-Ala-D-Ala إلى D-Ala-D-lactate بواسطة كاسيت الثلاث إنزيمات VanH-VanA-VanX، دور VanX وMurF في تجزئة D-Ala-D-Ala مقابل D-Ala-D-Lac للتدمير أو الاستطالة.



الشكل (١٠,٨). خسارة احد روابط الهيدروجين بين الفانكوميسين وD-Ala-D-lactate يتيح انخفاض ألف–ضعف في انجذاب الربط.

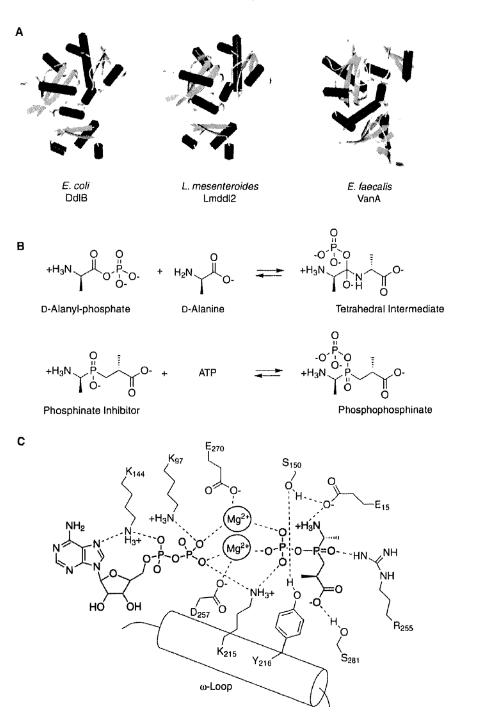
VanH هو إنزيم بيروفيت مختزل (pyruvate reductase) (د–لاكتيت نازع للهيدروجين (D-lactate dehydrogenase) في الاتجاه المعاكس) مستعملاً NADH ليختزل C_2- كيتون إلى C_2-OH في اللاكتيت، مع تحكم رئيسي لينتج D-lactate. وتوفر حامض د–هيدروكسي (D-hydroxy acid) هذا بكميات كبيرة يسمح الآن لإنزيم VanA ليعمل كإنزيم رابط (ليغاز) للديبسي ببتيد (D-Ala-D-lactate depsipeptide ligase) مع ١٥٠ تفضيل –إلى–١ عند pH 6 لصنع د–الآنين–د–لاك D-Ala-D-Lac على D-Ala-D-Ala (ليسارد وآخرون Lessard *et al.*, 1999). وفي هذه الأثناء ظل يعمل د–الآنين–د–الآنين D-Ala-D-Ala ليغازالأصلي لينتج ناتجه، د–الآنين–د–الآنين D-Ala-D-Ala وبهذا سيكون هناك كلا د–د–ثنائ الببتيد (D-D-dipeptide) و د–د– ديبيسي ببتيد (D-D-depsipeptide) (الشكل ١٠,٦) في خلية VRE. وهذه طبيعياً تتنافس مع بعضها بعضاً للاستطالة بواسطة MurF، الإنزيم المضيف د–الآنين–د–الآنين (D-Ala-D-Ala-adding enzyme) الذي يحول ميوراميل الببتيد الثلاثي UDP- (UDP-muramyl tripeptide) إلى UDP –ميوراميل خماسي الببتيد (UDP-muramyl pentapeptide) لاختتام المرحلة السيتوبلازمية للبناء الحيوي للببتيدوغليكان (الفصل الثالث). ووجود الإنزيم الثالث، فان إكس VanX مطلوب لأنماط VRE الظاهرية رفيعة –المستوى، ويعمل فان إكس VanX بالتحديد كببتيداز د–د (D-D-peptidase) في حين أنه يجنب د–الآنين–د–لاكتات D-Ala-D-lactate من التحلل المائي (ليسارد وولش Lessard and Walsh, 1999). الانتقائية على أساس k_{cat} / K_m تقرب من 10^{10}، الفرق المذهل التي يضمن بقاء د–الآنين–د–لاكتات D-Ala-D-lactate فقط في الخلية التي تظهر VanH,VanA ، VanX. وبعد ذلك MurF ليس لديه منافسة من د–الآنين–د–الآنين D-Ala-D-Ala عندما يستعمل د–الآنين د– لاكتات D-Ala-D-lactate ليصنعيودي بي–ميوراميل ل–الآنين –د–غلوتامين– ل–ليسين–د–الآنين–د–لاكتات UDP-muramyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-lactate. والإنزيمات اللاحقة في مسار الببتيدوغليكان تمسك ديبسي ببتيد إلى مرحلة الدهن II.

وهذا التشابه هو ركيزة جيدة للربط– االتبادلي (التصالبي) للترانسبيبتيداز (الشكل ١٠،٩)، ويمكن من إنتاج طبقة الببتيدوغليكان المرتبطة– تصالبياً التساهمية والثابتة ميكانيكياً بحيث إن VRE لا تكون قابلة للتحلل الأوزموزي.



الشكل (١٠،٩). نهايات PG-D-Ala-D-Lac التي تعتبر مواد للربط – التصالبي المتواسط بالترانسبيبتيداز.

لاحظنا في الفصل السابع بأن منتجي مضاد غليكوببتيد الحيوية يستعملوا إستراتيجية مماثلة لتشغيل VanH,VanA وVanX المناظرات لإعادة برمجة طبقات الببتيدوغليكان التابعة لها وتولد حماية مناعة–ذاتية لإجراءات مضادّات الغليكوببتيد التي تصنعها وتصدرها (الشكل ٧،٩). ومثل هذه الجينات المنتجة قد تكون المصدر لكاسيت الإنزيمات–الثلاث في VREs المُمْرضات الانتهازية. ولقد تم تحديد تراكيب أشعة–إكس لـأنزيم ليغاز د–الآنين د–الآنين (D-Ala-D-Ala ligase) من الإشريكية القولونية (فان وآخرون Fan *et al.*, 1994)، ليغاز د–الآنين د–لاكتات (D-Ala-D-lactate ligase) من بكتيريا التربة لوكونوستوك ميزينتيرويديس *(Leuconostoc mesenteroides)* (كوزين وآخرون Kuzin *et al.*, 2000) التي لديها مناعة فطرية للفانكوميسين، و ليغاز فان A (VanA ligase) من VRE (روبير وآخرون Roper *et al.*, 2000)، مما أكد ى تماثلها في التركيب والتغييرات في الموقع النشط من Tyr_{216} إلى Phe_{216} إلى His_{216} عندما يتقدم أحدهم خلال الإنزيمات الثلاث (الشكل ١٠،١٠A) ويكتسب إنتقائية متزايدة لتكوين د–الآنين د–الآنين لاكتات D-Ala-D-lactate أكثر من د– الآنين –د–الآنين D-Ala-D-Ala. وجميع تراكيب أشعة–إكس الثلاث لها مثبطات فوسفينوفوسفيت (phosphinophosphate) مرتبطة، ومنتجة من الفوسفينيت (phosphinate) الذي يتفاعل مع ATP في الموقع النشط (الشكل ١٠،١٠ B وC). ويعدُّ الفوسفينيت فعال ضد ليغازات د– الآ– د –إكس (D-Ala-D-X ligases) في المختبر، ولكن هذه الجزيئات المشحونة لا تدخل إلى داخل السيتوبلازم البكتيري وهكذا فهي ليست فعالة ضد البكتيريا ككل.



الشكل (١٠,١٠). (A) تراكيب أشعة–إكس لليغاز د–الآنين د–الآنين D-Ala-D-Ala ligase من الإشريكية القولونية، ــليغاز د–الآنين د–الآنين D-Ala-D-Lac ligase من ليوكونوستوك مزينتيرويديز و ــليغاز فان أ –د–الآنين د–لاك VanA-D-Ala-D-Lac ligase من المكورة المعوية البرازية. (B) فسفرة مشابه دايألكيل فوسفينيت (dialkylphosphinate) في الموقع النشط لليغاز ينتج حالة – إنتقال مشابهة التي تسلك مسلك المثبط البطئ للربط–المحكم. (C) الرسم المعماري للموقع – النشط للإشريكية القولونية DdlB مع رابطة ADP فوسفوفوسفينيت. (بالإذن من شاي (Shi) ووالش Walsh (١٩٩٥)).

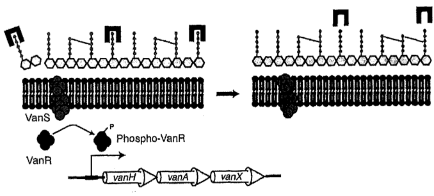
وامتداداً للفرضية بأن أنماط VRE الظاهرية تعكس إعادة البرمجة الجزيئية لليغازات د- الآنين د- الآنين D-Ala-D-Ala ligases هي ليغاز فان ج (VanC ligase) من المكورة المعوية جالينارم (نافارو و كورفالين Navarro and Courvalin, 1994). وهذا الإنزيم هو ليغاز د-الآنين د- سيرين D-Ala-D-Ser ligase، ويظهر حوالي ٣٥٠-ضعف إنتقائية لـ D-Ser في مكان $D\text{-}Ala_2$ في الموقع النشط لليغاز (بارك وآخرون Park *et al.*, 1997). كما أن حمل D-Ala-D-Ser للأمام بواسطة MurF ويليه البناء الحيوي للببتيدوغليكان يثمر عنه نهاية ببتيدوغليكان لها D-Ala-D-Ser حيث تتداخل السلسلة الجانبية CH_2OH لـ D-Ser مع التمييز بواسطة الفانكوميسين مقارنة مع تطابق سطحها المكمل للمجموعة الأصغر CH_3 للنهاية D-Ala. وانخفاض الانجذاب هو أكثر اعتدالاً، حوالي ١٠- أضعاف.

مشغَل VanB له مجموعة خمس-جينات مقارنة_ $VanS_B$,$VanR_B$,VanH,VanB, and $VanX_B$ — والمنطق الجزيئي لإنزيمات إعادة برمجة الببتيدوغليكان مشابهة لتلك التي في المشغَل VanA. ما الذي اختلف هو أن الملاحظة بأنه بينما كل من الفانكوميسين والتيكوبلانين يحرضان انتساخ الجينات الخمس للمُشغَل VanA فإنه فقط الفانكوميسين وليس التيكوبلانين الذي يُحرض مشغَل VanB (الجدول ١٠,١)، مما يفسر لماذا تبقى سلالات VanB حساسة للتيكوبلانين (آرثر وكورفالين Arthur and Courvalin, 1993). وهذه النتائج توحي بأن مضاد (مضادات) غليكوببتيد الحيوية هي المُحرِضة لـ VanA أو VanB (فانكوميسين فقط) وبالفعل، فالطفرات في بروتين مستشعر $VanS_B$ تحولها إلى لتستجيب للتيكوبلانين الخارج الخلية. ويبدو أن منطق المكونات الإثنين Vans-VanR نموذجي لهذه الأنظمة الإستشعارية/والمحولة البكتيرية (والش وآخرون Walsh et al.,1996 B). يستشعر الفانكوميسين في البيئة الخارجية الدقيقة بواسطة حقل إكسو لـ VanS، إما مباشرة أو غير مباشرة بواسطة بعض أجزاء من الببتيدوغليكان كما في نظام استشعار -AmpC (انظر الفصل الثامن). وهذه الإشارة تحول عبر الغشاء نحو حقل هيستدين كيناز (histidine kinase) السيتوبلازمي لـ VanS، والذي يفعل ذاتياً ليفسفر شريكه الوحدة الفرعية ثنائي الجزء في ترانس *(trans)* (الشكل ١٠,١١).

وبإمكان الشكل فوسفو-هيس (phospho-His form) من VanS أن ينقل مجموعة PO_3- إلى البروتين المنظم للاستجابة النوعية VanR، وعنصر الانتساخ ثنائي الحقل، إلى السلسلة الجانبية Asp في حقل نهاية-N. والشكل فوسفو-Asp (phospho-Asp form) من حقل نهاية-N من VanR يوصل هذه الشحنة في حالة الفسفرة إلى حقل ربط نهاية-C لـ دنا ويحدث التفعيل الانتساخي لـ *VanH,VanA* و *Vanx* لتبدأ إعادة البرمجة. وهناك بعض الأدلة على أنه في حالة التخلف في الأنماط الظاهرية VanA، يعمل VanS في طريقة شبكة ككيناز VanR، بينما $VanS_B$ ربما يعمل في حالة الاستراحة غالباً كفوسفتاز ليُفسفر- Asp $VanR_B$.

وبالنظر بأن الأنماط الظاهرية VanA و VanB من VRE تجمع خمسة جينات لتجعل إعادة برمجة PG أن تغير رابطة هيدروجين واحدة على الفانكوميسين، هناك عدة طرق لعكس النمط الظاهري. إحدى الطرق هي استعمال VanS,VanR,VanH,VanA وVanX كأهداف للجزيئات التي تبطل فعاليتها، ولقد تم وصف بعض مثبطات VanX (أراوز وآخرون Araoz *et al.*, 2000).

ومثل هذا المثبط في توليفة مع الفانكوميسين سوف يحاكي استراتيجية أوجمنتين (Augmentin) لمضادّات بيتالاكتام الحيوية (انظر الفصل الثامن). الإستراتيجية الثانية قد كانت للفحص (للمسح) ضد VRE مع الغليكوببتيدات التي تحتفظ بنشاط المضاد الحيوي. وأدى ذلك إلى نسخ شبه اصطناعية من الغليكوببتيدات السكرية الدهنية (ليبوغليكوببْتيدات) (lipoglycopeptides) مثل LY333328 (انظر الفصل الخامس عشر، الشكل ١٥,٦) التي تعتبر ٨٠–١٠٠ أضعاف أكثر فعاليّة من الغليكوببتيدات الأبوية التي تفتقر لسلسلة الدهن، مستعيداً اثنين من ثلاثة من سجلات النشاط (الفعاليّة) التي فقدت ضد النمط الظاهري VRE. وهذا المركب هو في التطوير السريري تحت اسم أورتافانسين (ortavancin). وبإمكان شطر كلوروبيفينيل الراهب للماء (chlorobiphenyl) أن يتحرك حول سلسلة ثنائي السكريد (جي وآخرون Ge *et al.*, 1999) ويستعيد نشاط VRE، مما يوحي بان الدهن هو مرساة غشاء ليعيد تركيز غليكوببتيد الدهني ويوفر تركيز أعلى وفعال عند السطح الخارجي للغشاء حيث تتم الربطات–التصالبية للببتيدوغليكان، ولقد افترض بأن مثل هذه المشتقات الراهبة للماء من الغليكوببتيدات تثبط انتقائياً عملية (إنزيمات ناقلة الغليكوزيل) ترانسغليكوسيلازات (transglycosylases) في VRE، لتعيد توجيه هذه الأدوية المرشحة من تثبيط ترانسببتيداز نحو أهداف جديدة (جي وآخرون Ge *et al.*, 1999، سن وآخرون Sun *et al.*, 2001).



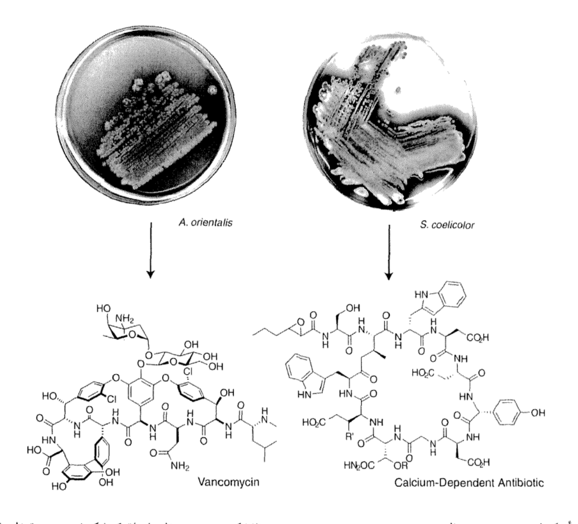
الشكل (١٠,١١). الفرضية لـ VanS-VanR مستشعر كيناز/منظم الإستجابة لتشغيل جينات *VanH,vanA,and vanX* لإعادة برمجة البناء الحيوي للببتيدوغليكان.



البناء الحيوي للمضاد الحيوي
ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS

في هذا الباب من الكتاب درسنا الإستراتيجيات للبناء الحيوي للأصناف الرئيسة من المضادّات الحيوية. وتم شرح المنطق والماكينة للمضادّات العطرية المشتقة – من البوليكيتيد والنموذجية في الفصل الثاني عشر. ويفحص الفصل الثالث عشر إستراتيجية تجميع – الخطوط الموازية لأصناف مضادّات البِبْتيد غير الريبوسومية وتشمل بينيم (penem)، أوكسابينيم (oxapenem) وكاربابينيم. ويتناول الفصل الرابع عشر سبل البناء الحيوي للأصناف الأخرى من المضادّات الحيوية، وتشمل أمينوكيومارينات (aminocoumarins) وأمينوغليكوسيدات. البناء الحيوي لتربين (terpene) ومنتجات ألكالويد (alkaloid) الطبيعية، البعض منها له فعاليّة مضاد حيوي لم تتم مناقشتها. يوجَّه القراء إلى المجموعة متعدِّدة الأجزاء *(كيمياء المنتجات الطبيعية الشاملة)* *(Comprehensive Natural Products Chemistry)* (بارتون وآخرون Barton *et al.*, 1999) لهذه المواضيع وسيق أوسع من الجزيئات من الفصل الثاني عشر إلى الرابع عشر.

وقدمنا هذا الباب مع الفصل الحادي عشر، والذي يلخص ما يعرف حول الجينات والبروتينات التي تتحكم بتوقيت صنع المضادّات الحيوية في الكائنات المنتجة. وهذا متمم للفصل السابع، حيث تم فحص آليات الدفاع لمنتجي المضادّات الحيوية عند مستوى البروتين. والبكتيريا من رتبة الفطار الشعية *(Actinomycetales)* وبالتحديد عائلة المتسلسلات *(Streptomycetes)* ضمن تلك الرتبة، هي مولدات غزيرة للأسلحة الكيميائية ضد جيرانها، وتنتج ما يقدر بنحو ١٢,٠٠٠ مضاد حيوي طبيعي معروف (تشامبنيس Champness, 2000). ومسارات الإشارة الجزيئية التي قد بدئ بفك شفرتها في المتسلسلات، وبالأخص في المتسلسلة كوليكولر *(Streptomyces coelicolor)*، يحتمل بأن تكون منافع عامة لتحليل المنطق لمنتجي المضاد الحيوي.



أميكولاتوبسيس اورينتالاز *(Amycolatopsis orientalis)* منتج الفانكوميسين، والمتسلسلة كوليكولر، منتجة المضاد الحيوي المعتمد-على الكالسيوم.

الفصل الحادي عشر

تنظيم البناء الحيوي للمضاد الحيوي في الكائنات المنتجة
REGULATION OF ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS IN PRODUCER ORGANISMS

تنظيم إنتاج المضاد الحيوي في المتسلسلات

من مضادّات السيركا (circa) الـ ١٢,٠٠٠الحيوية المعروفة، قد قُدر أن بعض ١٦٠ ما زالوا أو قد كانوا في الاستعمال السريري للإنسان. المتسلسلات، البكتيريا الموجبة– لغرام الخيطية، مسئولة عن إنتاج حوالي ٥٠٪ من هذه المضادّات الحيوية الهامة تجارياً (تشامبنيس Champness, 2000).

الجدول (١١,١) يلخص ٢٦ من الأمثلة، تشمل كل من بوليكيتيد (عديد الكيتيد) الدورية الكبيرة (macrocyclic) والعطرية، الببتيدات غير الريبوسومية، بيتا لاكتامز، تراكيب بوليكيتيد – ببتيد الهجين، كيومارينات وبوليبيرولات (polypyrroles)، التي تختلف في التراكيب وطرق العمل المضادة البكتيرية. عديد من المركبات في هذا الجدول شرحت بالتفصيل في الفصول الأخرى من هذا الكتاب. ومضادّات المتسلسلات والشعيات الحيوية هذه تشترك في سمة عامة بأن بناءهم الحيوي غالباً ما يكون منسقاً بشكل مؤقت مع التغييرات الأخرى في مورفولوجيا (أشكال) المستعمرة، وبالتحديد التغييرات التطويرية التي تشمل الفطور الغصينية الهوائية (aerial mycelia) وتكوين الأبواغ (spore formation) (انظر بيب وآخرون Bibb *et al.*, 2000، والمراجع فيه، تشاكرابورتي وبيب Chakraburtty and Bibb, 1997). الظروف المتنوعة، وتشمل الغذاء المحدود، يستطيع أن يبدأ كل من برامج التطويرية وإنتاج المضاد الحيوي، ولقد أصبح واضحاً بوجود شبكات من الإشارات التنظيمية والنظم التي تتقاطع وكذلك تجري بالتوازي. إن فهم ماكينة (آلات) تنظيم جين المضاد الحيوي سوف تزيد فرص التعزيز العقلاني والتحكم بمستويات المضاد الحيوي وتساعد في الحصول على سبل بناء حيوي مجتمعة لتوظف في جسم الإنسان.

الجدول (١١,١). مضادّات الشعيات الحيوية المنتقاة.

المضاد الحيوي	المنتج	الصنف [١]	الهدف [٢]	الاستعمال
أفيرميكتين (Avermectin)	المتسلسلة أفيرميتيلس	ماكروليد (PK)	قنوات أيون الكلوريد	مضاد للطفيليات
بليوميسين (Bleomycin)	"المتسلسلة فيرتيكيليس"	غليكوببتيد (ببتيد سكري)	كسر خيط دنا	مضاد للورم
كلورامفينيكول	المتسلسلة فنزويلي	إن-دايكلورأسيل فينيل بروبانويد	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
كلوروتتراسيكلين	المتسلسلة أوريوفاسينس	تتراسيكلين (PK)	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
حامض الكلافولينيك	المتسلسلة كلافوجيريس	بيتا لكتام	مثبط للبيتالاكتاماز	يتحد مع بيتالاكتام مكضاد بكتيري
دابتوميسين (Daptomycin)	المتسلسلة روزيوبوروس	ليبوببْتيد (ببتيد دهني)	؟ حامض ليبوتيكويك	مضاد بكتيري
دونوروبيسين (دونوميسين) (Daunorubicin) (daunomycin)	المتسلسلة بيوسيتيكس	أنثراسيكلين (Anthracycline)(PK)	إقحام دنا	مضاد للورم
إريثروميسين	سكاروميسس إريثري	ماكروليد (PK)	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
FK506 تاكروليمس (tacrolimus)	المتسلسلة هيجروسكوبيكس	ماكروليد (PK)	يرتبط مع بروتين FK	مثبط للمناعة
فوسفوميسين	أنواع المتسلسلة	حامض الفوسفونيك	ببتيدوغليكان	مضاد بكتيري
جنتاميسين	أنواع ميكرومونوسبورا	امينوغليكوسيد	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
كاناميسين	المتسلسلة كاناميسيتيكس	امينوغليكوسيد	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
ميتوميسين C	المتسلسلة كاسبيتوسس، المتسلسلة فيرتيكولاتس	بنزوكوينون	ربط- تصالبي لـ دنا	مضاد للورم
نوكاردسين (Nocardicin)	النوكارديا ينيفورميس	بيتالاكتام	ببتيدوغليكان	مضاد بكتيري
نوسيهيتيد (Nosiheptide)	المتسلسلة أكتوسس	ثيوببْتيد	رباط الريبوسوم	محفز النمو
نوفوبيوسين	المتسلسلة نيفيس	كيومارين غليكوسيد	ناد غيراز (الوحدة الفرعية — β)	مضاد بكتيري
أولياندوميسين	المتسلسلة أنتيبوتيكس	ماكروليد (PK)	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
أوكسيتتراسيكلين	المتسلسلة ريموسس	تتراسيكلين (PK)	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
بريستيناميسين	"المتسلسلة بريستينيسبيراليز"	ماكرولاكتون ببْتيدي + عديد الماكرولاكتون غير مشبع (PK)	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
ريفاميسين	أميكولاتوبسيس المتوسطية (Amycolatopsis mediterranei)	أنساميسين (PK)	RNA بوليميراز	مضادبكتيري (الدرن والجذام)
تيكوبلانين	أكتينوبلانيس تيكوميسيتيكس	غليكوببتيد (ببتيد سكري)	ببتيدوغليكان	مضاد بكتيري

تابع الجدول (١١,١).

المضاد الحيوي	المنتج	الصنف [١]	الهدف [٢]	الاستعمال
تتراسيكلين	المتسلسلة أوريوفاسينس	تتراسيكلين (PK)	ربط الريبوسوم	مضاد بكتيري
ثيناميسين	"المتسلسلة كاتليا"	بيتالاكتام	الببتيدوغليكان	مضاد بكتيري
تيلوسين	المتسلسلة فرادي *(S.fradiae)*	ماكروليد (PK)	ربط الريبوسوم	محفز النمو
فانكوميسين	أميكولاتوبسيس اورينتاليز	غليكوببتيد	الببتيدوغليكان	مضاد بكتيري
فرجينياميسين (Virginiamycin)	المتسلسلة فرجينيي *(S.virginiae)*	لاكتون حلقي كبير (PK) + بِبْتيدولاكتون حلقي كبير	ربط الريبوسوم	محفز النمو

[١] PK : بوليكيتيد   [٢] ربط الريبوسوم يثبط بناء البروتين   مقتبس بالإذن من كيسير وآخرون Kieser *et al.*, 2000.

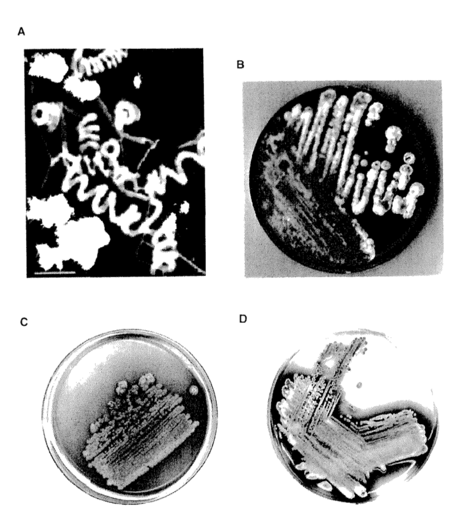
الشكل (١١,١) يظهر الصور المجهرية لمزارع المتسلسلة أفيرميتيليز *(Streptomyces avermitilis)* منتجي أفيرميكتين (avermectin)، المتسلسلة كلافوليجريس *(Streptomyces clavuligerus)*، منتج كلافولينيت، أميكولاتوزيز أورينتاليز *(Amycolatosis orientalis)* منتج فانكوميسين، المتسلسلة كوليكولور، الكائن المضيف للعديد من الطرق المأشوبة (recombinant) نحو البناء الحيوي المجتمع، شَرح في الفصلين الثاني عشر والسادس عشر.

لقد كانت المتسلسلات المنتجة للعديد من مختلف المضادّات الحيوية ذات قيمة في شرح بعض المنطق الجزيئي الذي يتحكم في التوقيت وكميات إنتاج المضاد الحيوي، مستعملاً الحواجز الوراثية للتأثير على إنتاج المضاد الحيوي كطريق مثمر لتحديد هوية ووظيفة الجين. في الوقت الحالي يوجد بعض الفهم لطبقتين من الشبكات المنظمة والأولى تستعمل عنصرين مستشعر كيناز/وماكينة منظم الاستجابة للتنظيم العالمي والثاني يستعمل جزيئات نصاب/ الاستشعار الذي ينتقل بين الخلايا ولقد سميت "هورمونات" المتسلسلات لمسار- نوعي للتنظيم (تاكانو وآخرون Takano *et al.*, 2000، يامادا ونيهارا Yamada and Nihara, 1999).

التسلسل لجين *S.coelicolor* قد تم تحديده حديثاً (بينتلي وآخرون Bentley *et al.*, 2002) ووجد أن يحتوي على ٧,٨٢٥ جينات مفترضة، تقريباً ضعف محتوى جين الإشريكية القولونية (٤,٢٨٩) العصية الرقيقة (٤,٠٩٩). تناسباً مع الجين الكبير والإظهار الانتقائي للجين في تربة بيئات جلية يوجد عدد هائل من الجينات المنظمة، ٩٦٥ جينات تمثل أكثر من ٢٥٪ من الجينات. وتشمل هذه ٦٥ عناصر σ التي تتحكم في نوعية تمييز المحرض للب الوحدات الفرعية لرنا بوليميراز (RNA polymerase) ليسمح بالانتساخ الانتقائي لمجموعات من الجينات وعلى الأقل ٥٣ زوج من ثنائي المكونات من مستشعر كيناز عبر الغشاء / منظمات الاستجابة لانتساخ الجين استجابة للإشارات الخارجية. ويفترض بأن عشرين من مجموعات الجينات التي تشفر الإنزيمات التي تعمل في المسارات الأيضية الثانوية، وتشمل

بعض المضادّات الحيوية من الشكل (١١.٢). والعديد من مجموعات جينات هذه المنتجات الطبيعية الثانوية توجد في الخارج على حافة كروموسوم *S.coelicolor* الخيطي ويعتقد بأنها أضيفت للكروموسوم اللب- المشفر الوظيفة (بينتلي وآخرون Bentley *et al.*, 2002). المواضع المحيطية لكروموسومات المتسلسلة الأخرى قد تكون مواقع لجينات بناء حيوي للمضادّات الحيوية الإضافية.

المثال الثاني للبكتيريا التي تستعمل إشارات النصاب للبناء الحيوي لجين المضاد الحيوي هي مُمْرض النبات إروينيا كاروتوفورا (*Erwinia carotovora*)، التي تنظم تجميع الكاربابينيم، كما سنلاحظ في نهاية الفصل (سويفت وآخرون Swift *et al.*, 1996).



الشكل (١١,١). (A) المتسلسلة أفيرميتيليس (بالإذن من ميادوه وآخرون Miyadoh *et al.*, 1997)، (B) المتسلسلة كلافوليجريس (بالإذن من www.cbs.umn.edu/asirc,© ، ١٩٩٧)، (C) كولوفوبسيس أورينتاليز، (D) المتسلسلة كوليكولر.

Actinorhodin

Undecylprodigiosin

Calcium-Dependent Antibiotic

Methymycin

الشكل (١١,٢). تراكيب الأيضات الثانوية المنتجة بواسطة المتسلسلة كوليكولر.

المنظمين العالميين لإنتاج المضاد الحيوي في المتسلسلة كوليكولر (*S.coelicolor*):

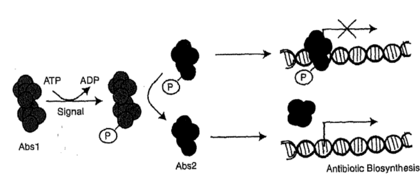
المنظمين ذوي-الشقين (two-component regulators)

من تسلسل مجين المتسلسلة كوليكولر، يمكن للمرء تحديد مجموعات الجينات للمضادّات الحيوية الأربع المعروفة من هذه البكتيريا: أكتينورودين (actinorhodin) (بوليكيتيد)، أنديسيلبروديجيوسين (undecylprodigiosin) (بوليكيتيد-بوليبيرول مهجن) (hubrid polyketide-polypyrrole)، المضاد الحيوي -المعتمد على الكالسيوم (CDA) (ببتيد غير الريبوسومي)، وميثيلينيميسين (methylenemycin) (بوليكيتيد) (الشكل ١١,٢). وقد كشفت الفحوصات الوراثية عن طفرات عند الموضع *abs* الذي يعاني من نقص الإنتاج لجميع المضادّات الحيوية الأربعة، كما لو أن الشبكة العالمية التنظيمية كانت مسدودة. وبين رسم الخرائط وتحليل التسلسل اثنين من بروتينات Abs، Abs1 وAbs2، التي هي قريبة من مجموعة CDA جين البناء الحيوي (انظر بيب Bibb, 1996). وللزوج Abs1-Abs2 جميع سمات التسلسل المتنبأ لنظام الشّقين-الاثنين التنظيمي المعياري مع Abs1 هيستيدين كيناز عبر الغشاء وAbs2 المحتوي على-أسبارتيت منظم الاستجابة (aspartate-containing response regulator) الذي يحدث له فسفرة بواسطة الشكل فوسفو-هيس (phospho-His form) من Abs1. والشكل فوسفو- Asp من Abs2 هو منظم سالب للجينات المستهدفة، التي تشمل مسار المضاد الحيوي -عناصر انتساخ نوعية التي سوف تُشرح أدناه. وهكذا في غياب بعض الإشارات على العكس من ذلك الوضع المتخلف (الافتراضي) هو أن Abs2 يتفسفر ويحتفظ بانتساخ الجينات المستهدفة

ليتحكم بجينات، كتلة البناء الحيوي للمضاد الحيوي المغلقة (الشكل ١١,٢). كما أن هوية الإشارة ليست معروفة إلى الآن، وربما تكون ربيطة (ligand) للحقل الخارج الخلية أو عبر الغشاء لـ Abs1 الذي يحول هذا النظام الثنائي المكونات من الإيقاف إلى التشغيل ويريح كبت الجين. والتكهنات المعقولة التي تعتمد على منطق النظام الثنائي- المركبات الآخر، هو أن الاستجابة للإشارة غير المعروفة هو أن تبديل Abs1 من وضع كيناز إلى وضع فوسفتاز، محرضاً التحلل المائي لـ P-Asp-Abs2 إلى الشكل ديفوسفو (منزوع الفوسفو) (dephospho form) (الشكل ١١,٣)، مع فقد انجذاب الربط لاستهداف مناطق حفّازات الجين، وإطلاق dephospho-Abs2 الذي سوف يسمح بالشروع في انتساخ الجين المستهدف.

ربما لا يكون زوج Abs1-Abs2 المنظم الوحيد عالمياً الذي يتحكم بتوقيت إظهار الجين البنائي الحيوي للمضاد الحيوي في هذه وفي المتسلسلات الأخرى. وعلى سبيل المثال، يوجد Abs2 مشابه (مناظر)، RedZ، في تجمع أنديسيلبروديجيوسين (undecylprodigiosin).

وكذلك، زيادة إظهار لزوج ثنائي المكونات آخر، AfsQ1-AfsQ2، سيكون بديلاً. كما أن طرد (خروج) Abs سيؤدي إلى الإنتاج المبكر لجميع مضادّات المتسلسلة كوليكولر الحيوية في غضون ساعات إلى أيام وبكميات تصل إلى ٦٠- ضعف أعلى من الطبيعي، معتمدة على ظروف التزريع. وهناك تكهنات بأن التحكم بتوقيت إنتاج المضاد الحيوي بواسطة الحصيرة الفطرية الغصينية (mycelial mat) لربما يكون من المهم عدم التدخل في التنفيذ الناجح لبرنامج التطوير، مثال، إنتاج الأبواغ بواسطة الخيوط الفطرية الهوائية (aerial hyphae). تأخير إنتاج الببْتيد الدهني CDA المكوّن-للمسام، على سبيل المثال، قد يكون مهماً لتجنب الانسمام الذاتي. والنظام الثنائي- الشقّين الثالث، جينات *cutR* و*cutS*، يعمل كذلك في التنظيم السالب لإنتاج المضاد الحيوي (تشانج وآخرون Chang and Roth, 1996)، مما يقترح وجود عدة نقاط تقاطع للاستشعار البيئي وإظهار جينات البناء الحيوي للمضاد. وتوفر تسلسل مجين المتسلسلة كوليكولر سوف يسمح الآن بالتحليل المنهجي لدور كل من الـ ٥٣ نظام الثنائي -المكونات في إنتاج المضاد الحيوي.



الشكل (١١,٣). المنطق التنظيمي لثنائي المكونات للتحكم بانتساخ جين المضاد الحيوي بواسطة Abs1 و Abs2 في المتسلسلات.

مسار المضاد الحيوي – التنظيم النوعي في المتسلسلات بواسطة بيوتانيوليدات (butaneolides)

التحليل الأكثر شمولاً لتنظيم مسار المضاد الحيوي المحدد، خطوة واحدة إلى الأسفل من النظمين العالميين Abs من المحتمل في المتسلسلة فيرجينيي في إنتاج المضادين الحيويين فيرجينياميسين (virginiamycin M1) وفيرجينياميسينS1 (virginiamycin S1) (الشكل ١١,٤). ولقد تم عزل فيرجينياميسينات مرات متعدِّدة كما أن فيرجينياميسين M1 قد كانت معروفة ببريستسناميسين IIA (pristinamycin IIA) وستربتوجرامين A (streptogramin A). وجزيء M1 هو ماكرولاكتون الذي يعدُّ هجين للبوليكيتيد مع شطر أوكسازوليل–زوليل المشتق من ثنائي البِبْتيد. المكون S1 هو ببتيد سداسي حلقي مع لاكتون أو رابطة ديسيببتيد بين Thr_1 و $PheGly_6$. و ThR_1 له أريل– إن –كاب (aryl-*N*-cap) مثالياً مع لإستراتيجيات بدء السلسلة في مضادّات البِبْتيد الحيوية غير الريبوسومية. ولقد تم توضيح مجموعة الجينات لزوج بريستسناميسين المشابه الذي يشكل التوليفة المضادة البكتيرية سينيرسيد (انظر الفصل الرابع) (بودزدوجان وليسليرك Bozdogan and Leclercq, 1999، سلطاني وآخرون Sultani *et al*., 2001). المنطق الإنزيمي لتكوّن (البناء) الحيوي لمثل هذا الببتيد وخليط مضادّات بوليكيتيد/ببتيد الحيوية تم فحصه في الفصل الثالث عشر.

Virginiamycin M1

Virginiamycin S1

الشكل (١١,٤). تراكيب مضادّات فيرجينيا ميسين الحيوية.

جزيئات الإشارة بيوتانيوليد (Butaneolide)

إن التحكم في إنتاج فيرجينياميسينات في المتسلسلة فيرجينيي (*S.virginiae*) مضادّات النيوكليوسيد الحيوية شودوميسين ومينيميسين (Showdomycin and minimycin) في المتسلسلة لافينديولي (*Streptomyces lavendulae*)، المضادّات الحيوية الأربعة من المتسلسلة كوليكولر (انظر "إنتاج المضاد الحيوي في المتسلسلات" أعلاه)، دونوروبيسين (daunorubicin) في المتسلسلة بيوسيتس (*S.peucetius*) وغيرها العديد من مضادّات المتسلسلة المشكوك بها من الجدول (١١,١) متواسطة بواسطة تفاعل بروتينات انتساخ كابتة معينة مع روابط صغيرة نافذة للخلية، البيوتانيوليدات. لاحقاً في هذا الفصل وفي أماكن أخرى من هذا الكتاب (مثل الفصل الخامس عشر) نلاحظ بأن البكتيريا السالبة–لغرام تستعمل إن– أسِّيل هوموسيرين لاكتونز (*N*-acylhomoserine lactones (*N*-acyl-HSLs)) كجزيئات تأشير

نافذة- للخلية التي تعكس تراكيزها كثافة الخلية البكتيرية وذلك تعمل كمستشعرات النصاب. والجزيئات التي يرجَح أن تكون بـمثابة مستشعرات نـصاب متكافئ في البكتيريا المتسلسلة الموجبة-لغرام هي γ- بيوتايرولاكتونات (γ-butyrolactones)، الآكتونات ذوات الخمس- حلقات المماثلة لـ acyl- HSLs ولكن تفتقر لمجموعة أمينو (الشكل ١١,٥). السلسلة الجانبية راهبة الماء من البيوتيرولاكتونات، كذلك تعرف جنسياً بالبيوتانيوليدات، وهي في نفس الموضع مثل شطر N- أسيَل لنصاب الجزيئات السالبة- لغرام. هناك اختلافات في طول السلسلة الجانبية وبالتحديد في حالة الأكسدة والكيمياء المُجسَمة (الكيمياء الفراغية) (stereochemistry) للبديل ٦-أوكسو من البيوتانيوليدات بين أنواع المتسلسلة (يامادا ونيهارا Yamada and Nihara, 1999). وفي العنصر بيوتانيوليد- A (A-factor butaneolide) للمتسلسلة جريسيس، هو كيتون، في النوع Im2- بيوتانيوليد من المتسلسلة لافينديولي، وهو 6-*β*-OH، بينما في المتسلسلة فيرجينيي، هو 6-α-OH (الشكل ١١,٦). البناء الحيوي لبدائل بيوتيرولاكتوز هذه من الأرجح أن ينشأ بواسطة التكثيف الإنزيمي لأيضات الكربونات الثلاث الأولية ثنائي هيدروكسي أسيتون- P (dihydroxyacetone –P) حيث يهاجم C_1-OH مجموعة كربونيل المنشَطة لثيوإيستر *β*-keto-acyl-S-CoA أو *β*-keto-acyl-S-ACP (أسيل حامل البروتين). هذا الوسيط سيمر بعد ذلك بتكثيف ألدول (aldol) داخلي جزيء، تجفاف، واختزال إينون (enone reduction) لتسفر عن حالة أكسدة ٦- كيتو التي توجد في عنصر-A -للمتسلسلة جريسيس (الشكل ١١,٧). إنزيم ريدكتاز التجسمي النوعي (sterospecific reductase) من شأنه أن يتحكم في الإنتاج الآحق لمتغيرات ٦-ألفا و٦- بيتا التجسمية الكيميائية (يامادا ونيهارا Yamada, and Nihara, 1999).

هذه الجزيئات الصغيرة التي تنتجها خلية واحدة يمكن أن تنتشر إلى داخل خلية المتسلسلة المجاورة بطريقة تعتمد على كثافة الخلية وتستطيع أن تكوَن معقد مع البروتين المستقبل داخل الخلية مع انجذاب يبلغ جزءاً من بليون من المول (nanomolar). وفي المتسلسلة لافينديولي البروتين الشريك لـ ٦- بيتا- بيوتانيوليد هو المستقبل ArpA بينما في المتسلسلة فيرجيني يرتبط ٦- ألفا- هيدروكسي بيوتيرولاكتون (6-B-hydroxybutyrolactone) يرتبط بمستقبلات BarA المناظرة (الشكل ١١,٦).

تعدُّ عناصر الانتساخ النوعية-لمسار المضاد الحيوي FarA, ArpA, BarA قوامع انتساخ في غياب ربيطات بيوتانيوليد (butaneolide ligands). وعلى سبيل المثال، يجلس BarA على مواضع التحريض ويفقدهم. يعفى التنظيم السالب عن ربط بيوتانيوليد؛ بسبب أن للمعقد انجذاب أقل للـ دنا ويهبط بعيداً، ومن ثم يتوقف القمع ويمكن لانتساخ الجين بالبدء.

Acyl Homoserine Lactones
(Gram-Negative)

Butyrolactones
(Gram-Positive)

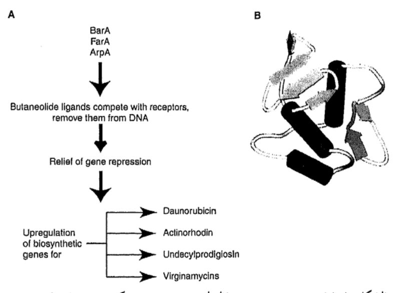
الشكل (١١,٥). مقارنة اكتمال نصاب جزيئات الاستشعار.

الشكل (١١,٦). مختلف حالات الأكسدة والإختزال عند جزيئات C_6 بيوتانوليد استشعار النصاب والتفاعل التفريقي مع قوامع المتسلسلة الانتساخية **ArpA, FarA, and BarA**.

الشكل (١١,٧). مسار البناء الحيوي المفترض لنصاب استشعار بيوتيانوليدات.

تحقيق تكامل الدائرة التنظيمية لإنتاج المضاد الحيوي في المتسلسلات

لقد حدد التحليل الوراثي (الجيني) أحد أهداف البروتين القامع (الكابت) BarA مثل الجين *vmsR*. و *vmsR* له نواظر في مسارات-المتسلسلة الأخرى-المنتجة للمضاد الحيوي : *dnrI* للدونوروبوسين، *actII-orf4* لأكتينورودين (actinorhodin) ، و*redD* لكتلة أنديسيبروديجيوسين (undecyprodigiosin) (كواتشي وآخرون Kawachi *et al.*, 2000). ولقد تم وصف منتجات البروتين لهذه الجينات المستهدفة بـ SARPs (البروتينات التنظيمية لمضادّات المتسلسلة) (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins) (تشامبنيس Cha mpness, 2000) وجميعها مناظرة لعناصر الاشريكية القولونية الانتساخية والبروتين الرابط لـ دنا، OmpR (الشكل ١١،٨). وينتمي OmpR لعائلة كبيرة من عناصر الانتساخ تسمى عائلة "الحلزون المجنَح — دورة - الحِلز" "winged helix-turn-helix" (مارتينيز-هاكيرت وستوك Martinez-Hackert and Stock, 1997 ، مارتينيز-هاكيرتز وآخرون ١٩٩٦م) .



الشكل (١١،٨). (A) تعتبر SARP نواظر لــ OmpR ، (B) تركيب عنصر انتساخ OmpR.

ومع البروتين الحساس المرافق له EnvF ، يعدُّ OmpR مكون الجين التنظيمي لنظام الشّقين الاثنين EnvF-OmpR الذي يتحكم في إظهار المسامات البكتيرية الخارج الخلية استجابة للتغيرات في التناضحية (osmolarity) الخارجية. ويزيد فوسفو-OmpR مع الزيادة في التناضحية ويرتبط بأكثر إحكام مع حفّاز جيناته المستهدفة ، ليقمع انتساخ *ompF* ويفعل انتساخ *ompC*. ومن المحتمل بأن SARP له أساليب بناء مقارنة بتلك في OmrR وتميز حفّازات الجين المستهدف بنفس الطريقة ، بواسطة فعل حقل نهاية N– (N-terminal domain) المفسفر بواسطة الشكل فوسفو من حساس كيناز المرافق وحقل نهاية- C الذي يرتبط بـ دنا الذي له انجذاب للهدف دنا معدل بواسطة حالة فسفرة حقل نهاية-N.

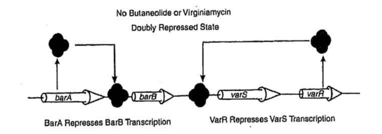
عندما ينتج البروتين VmsR بواسطة زيادة انتساخ جين *vmsR*، تكون النتيجة النهائية زيادة بناء كل من فيرجينياميسين M1 وS1. وسواء عمل VmsR مباشرة على جينات ببتيد سينثيتاز غير الريبوسومي وبوليكيتيد سينثيتاز التي ترمز مباشرة إنزيمات تجمع المضاد الحيوي أو ما إذا وجدت طبقة ثالثة من دائرة البروتين التنظيمي لا يعرف بعد. ويعدُّ *vmsR* نوعي لمسار المضاد الحيوي وليس لأي من مسارات التطويرية المنظمة المعاصرة بسبب أن النمط الظاهري للحسم (الضربة الحاسمة) نوعي لإنتاج فيرجينياميسين (كواتشي وآخرون Kawachi *et al.*, 2000). وبشكل مماثل، بروتين ArpA من المتسلسلة جريسيس في غياب ربيطة ٦- كيتو بيوتانيوليد يقمع إظهار مختلف الجينات. عندما يعاير نصاب-استشعار الربيطة ArpA خارج تتالي محفز دنا، يوجد ضمن جينات أسفل التيار المنتسخة كتلة جين بنائية حيوية لمضاد أمينوغليكوسيد ستربتوميسين (يامادا ونيهارا Yamada, and Nihara, 1999) (انظر الفصل الرابع عشر).

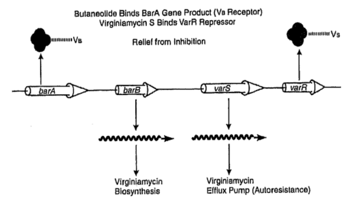
من المحتمل بأن تكون الطبقات الاثنين لتنظيم جين المضاد الحيوي في المتسلسلات، هي المستوى العالمي التي تأثرت بواسطة االشِّقين الاثنين الاستشعار/ المنظمات ومسار SARP النوعي لكل كتلة (مجموعة) مضاد حيوي، ستكون قالبة للتعميم وتستعمل منطق جزيئي لتستقبل مشعرات من البيئة عن متى تبدأ تشغيل إنتاج المضاد الحيوي. ذكرنا في الفصل السابع مختلف الأمثلة عن الآليات التي بواسطتها يزود منتجي المضاد الحيوي المناعة لذاتهم، ويشمل تنسيق البناء مع تصدير المضادّات الحيوي للمحافظة على تركيز المضاد الحيوي داخل الخلية تحت الحد المثبط للنمو.

التنظيم المؤقت لإنتاج وتصدير المضاد الحيوي يتمثل كذلك في قرين المتسلسلة فيرجينيي BarA. ومباشرة تحت تيار barA وbarB، يوجد اثنين من الجينات *varS* و *varR*. ويبدو بان بروتين varS هو مضخة تدفق فيرجينساميسين، مانحاً مقاومة ذاتية لمنتج المضاد الحيوي بواسطة المحافظة على تركيز داخل الخلية لهذا المضاد الحيوي المستهدف للريبوسوم منخفضاً. وهذه القدرة اكتسبت فقط في الوقت المناسب بواسطة زيادة انتساخ *varS* بواسطة إزاحة القمع بواسطة منتج الجين المجاور varR، المماثل للقامع TetR (انظر الفصل التاسع). في غياب الربيطات — ذات الجزيئات الصغيرة (Vb بيوتانيوليد لـ BarA وفيرجينياميسين S لـ VarS)، وبروتينات BarA وVarR تصبح مثنوية (dimerize) وترتبط بمواضع التحفيز في *barB* و *varS*، لتبقي الانتساخ عند مستويات قليلة أو منعدمة. وعندما يرتفع تركيز Vb بيوتايرولاكتون (زيادة كثافة الخلية) ليشبع BarA ويستطيع جزيء فيرجينياميسين S أن يرتبط مع VarR، ويخرج كل من معقدات القامع- الربيطة من مواضع تحفيز دنا الخاصة بها ويرتفع انتساخ *barB* و *varS*. وهناك حاجة لـ BarB للبناء الحيوي لفيرجينياميسين، بينما يعدُّ VarS مضخة التدفق التي سوف تسهل تصدير المضاد الحيوي عندما يتم إنتاجه (الشكل ١١،٩).

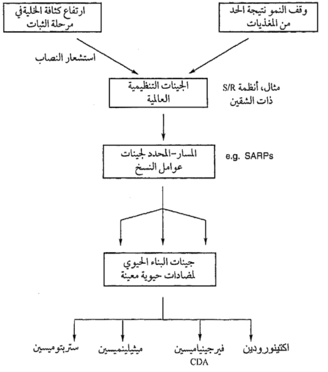
أشارت الدراسات حول مجموعة البناء الحيوي للمتسلسلة فراديي *(Streptomyces fradiae)* للميكروليد تيلوسين العضوية-١٦ (انظر الفصل الرابع عن آلية العمل والشكل ٤,٣ عن التركيب) (ستراتيجيوبولوس وكوندليف Stratigopoulos and Cundliffe, 2002) بأن مجموعة ٤٣- جين هذه التي تشمل 58 kb من دنا، لها خمسة جينات تنظيمية محددة، *tylS* ,*tylR* ,*tylQ* ,*tylP* و *tylT* تلائم (PARADIGM) لتنظيم المتسلسلة التي ذكرت سابقاً لصنف فيرجينياميسين. ويعتقد بأن بروتين TylP هو استشعار- نصاب مستقبل ويعتقد بأن بيوتانيوليد ومعقد الربيطة- المستقبل يرتبطا عند تتالي دنا مباشرة أمام جين *tylQ*، منهياً إنتاج TylQ. والانخفاض في TylQ يريح قمع انتساخ بروتين TylR، الذي يعدُّ منظماً عالمياً. وهذا يفعل إظهار جينات *tylS* و *tylT* لتنتج البروتينات TylS و TylT، التي تعتبر SARPs التي تبدأ تشغيل انتساخ بعض من جينات *tyl* بوليكيتيد سينثيتاز، وجينات البناء الحيوي منزوع الأكسجين (deoxysugar) *tyl*، المطلوبة لبدء تجمع تيلوسين. الخاصية الجديدة في تنظيم مجموعة جين تيلوسين هي الاكتشاف بأن TylQ هو القامع الذي عند المستويات العالية في خلايا المتسلسلة فراديي قبل أن ينتج التيلوسين وينتهي كإشارة مفتاح للمنظم العالمي كما أن انتساخات جين SARP لتبدأ. والإشارة لقفل انتساخ tylQ لم تحدد بعد.

وهكذا فالتخطيط لتنظيم إظهار جين البناء الحيوي للأصناف الرئيسة لمضادّات المتسلسلة الحيوية (بوليكيتيد، الببتيدات غير الريبوسومية، والأمينوغليكوسيدات) يبدأ بالتشكّل. إن توفر كامل تسلسل المجين للمتسلسلة كوليكولرسوف يسهل الفهم التفصيلي لكامل الشبكة التنظيمية مع التسلسل الهرمي ونقاط العقد لإشارة التكامل في المستقبل القريب. والآن بالإمكان القول بأن الإشارات الخارجية، وتشمل حدود الغذاء وما يلازمه من بطء النمو أو توقفه من ناحية وكثافة الخلية المعتمدة على- مستويات جزيئات إشارة بيوتانيوليد من ناحية أخرى، والأثر على مجموعة من الجينات التنظيمية العالمية، بعضها سوف يُشفر (يُرمز) نظم الاستشعار / الاستجابة ذات - الشقّين (الشكل ١١,٩). وبدورها، فهذه سوف تتحكم في التفعيل الانتساخي لعناصر الانتساخ النوعي — لمسار المضاد الحيوي التي سوف تسرع تنظيم الإظهار الانتساخي لمجموعة إنزيمات البناء الحيوي لتنتج لوحة (مجموعة) متنوعة من تراكيب المضاد الحيوي (الشكل ١١,١٠) (بيب Bibb, 1996). وبالإمكان التوقع أيضاً بأن تنظيم الإظهار للعديد من جينات الوحدة الفرعية σ (٦٥ في المتسلسلة كولي كولر) من رنا بوليميراز سوف يكون جزءاً من الاستجابة المتكاملة. وأظهرت الدراسة على المتسلسلة ليفيدانس *(Streptomyces lividans)* طفرات مقاومة- ريفامبيسين رنا بوليميرازفي الوحدة الفرعية بيتا التي أصبحت نشطة للبناء الحيوي لأكتينورودين وأنديسيل بروديوجيوسين بواسطة تسريع تنظيم انتساخ *redD* و *actII-orf4*. توحي هذه النتائج بأن الطفرات تؤدي إلى استقرار الوحدة الفرعية بيتا المطابقة (الملتزمة) التي تحاكي شكل رنا بوليميراز المحرض بواسطة الإشارات التي تبدأ الشروع في إنتاج المضاد الحيوي استجابة للمنبهات البيئية (هو وآخرون Hu *et al.*, 2000).





الشكل (١١,٩). بيوتانيوليد وفيرجينياميسين S في التنسيق المنظم للبناء الحيوي لفيرجينياميسين.



الشكل (١١,١٠). تخطيط لإدخال الإشارة والشبكات التنظيمية التي تتحكم بإنتاج المضاد الحيوي في المتسلسلات. (بالإذن من بيب Bibb, 1996).

تنظيم عوامل الفوعية والبناء الحيوي للمضاد الحيوي في البكتيريا السالبة–لغرام بواسطة استشعار –نصاب N–أسَيل هوموسيرين لاكتونات (*N*-acyl homoserine lactones)

يمكن الكشف عن المنطق التنظيمي للجينات المماثلة في التحكم بعوامل الفوعية وإنتاج المضاد الحيوي في البكتيريا السالبة–لغرام التي تنتج وتفرز أسيل –HSLs بدلاً من بيوتانيوليدات الموجبة– لغرام ككثافة خلية انتشارية معتمدة على استشعار–النصاب و–جزيئات إشارات. ونلاحظ مثالين لاحقاً.

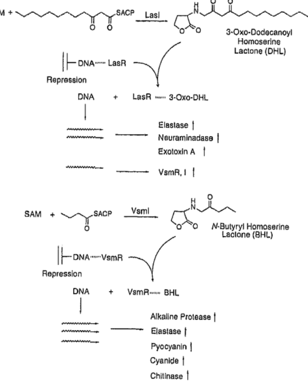
البكتيريا النباتية المسبِّبة للأمراض غالباً ما تفرز إنزيمات (إنزيمات خارجية) (exoenzymes) مع القدرة الحالة للماء لتدمر مكونات جدران الخلية النباتية لتطلق الغذاء الذي يمكن بعد ذلك أن يستعمل بواسطة المُمْرضات. الإروينيا كاروتوفورا (*E.carotovora*) هو أحد هذه المُمْرضات النباتية (phytopathogens) التي تستعمل الكثافة السكانية– المحركة للفيرومون (pheromone)/نظم إشارات– النصاب لتنظم سريعاً إنتاج وإفراز الإنزيم الخارجي لتهضم جدران خلية النبات لتجعل الغذاء متاحاً للبكتيريا المحدودة الموارد (سويفت وآخرون Swift *et al.*, 1996). وهذه الإروينيا تستعمل كذلك نفسها منطق الإشارة لتنظم تنسيقياً جينات للبناء الحيوي للكاربابينيم (الشكل ١١.١١). تقتل مضادّات البيتالاكتام الحيوية البكتيريا المجاورة التي من شأنها التنافس على غذاء الخلية النباتية المنبعث وتعقم البيئة الدقيقة باستثناء إروينيا المنتجة. يظهر الشكل (١١.١١) تخطيط لإنتاج ٣–كيتو–اوكتانويل هوموسيرين لاكتون (3-keto-octanoyl homoserine lactone (OHHL)) بواسطة إنزيم CarI لإروينيا كاروتوفورا وربطها مع البروتين الكابح الانتساخي CarR، مطلقاً معقد OHHL-Car من المواضع المحرضة للجينات المستهدفة وإعفاء الكبت الانتساخي. يدمر بناء وإفراز الإنزيم الخارجي تراكيب الخلية النباتية المضيفة، ليطلق الغذاء. وبالتوازي يقتل الكاربابينيم (انظر الفصل الثالث عشر لمسار لبناء الحيوي) البكتيريا المنافسة. هناك بعض المنافسات البكتيرية التي تعلمت أن ترد الضربة : تستطيع سلالات العصية الهشة أن تفرز أسيل– -HSL-لاكتونيز (acyl-HSL-lctonase) الذي يحلل مائياً جزيئات الإشارة الخارج الخلوية، تاركاً إروينيا كاروتوفا غير قادرة على صنع المضادّات الحيوية (دونج وآخرون Dong *et al.*,2000).

المثال الثاني هو المقدم بواسطة البكتيريا المُمْرضة الزائفة الزنجارية وبيولوجية استشعار النصاب لها. وما لا يقل عن اثنين من HSL_2 معروفة في هذه الكائنات السالبة — لغرام، 3-oxo-dD-HSL 3-keto-dodecanoyl-HSL و *N*-acyl-HSL حيث السلسلة أقصر ومشبعة، وهي *N*-butyrl-HSL (BHL) (الشكل ١١.١٢) (وينزر وآخرون Winzer *et al.*, 2000). ولقد اقترح بأن نظامي نصاب الاستشعار يعمل في تتالي هرمي (سويفت وآخرون ١٩٩٦) لإنتاج عناصر الفوعية. وكما هو مبين في الشكل (١١.١١)، فإن 3-oxo-Dd- HSL ينشأ أولاً بفعل سينثاز LasI (LasI synthase) عند كثافة خلية محددة. وترتبط هذه بانجذاب عالي مع قامع LasI ويسمح بانتساخ الجينات التي تصنع هذه الإنزيمات مثل إيلاستاز (elastase) ونيورامينيداز (neuraminidase) وبروتين السم الخارجي A. وكذلك يريح قمع انتساخ جين *vsmR*.

وبروتين VsmI هو أيضاً أسيل-HSL سينثيتاز، وهذه المرة لـ BHL، مستشعر نصاب قصير-السلسلة، الذي يعدُّ ربيطة نوعية لقامع VsmR. المعقد -BHL VsmR يوقع دنا بعيداً ويُفعل انتساخ المزيد من إيلاستاز و بروتياز القلوي (alkaline protease)، كيتيناز (chitinase)، بيوسينين (pyocyanin)، وسيانيد (cyanide).

SAM + SACP
CarI
OHHL
DNA ······ CarR
Repression
DNA + CarR ······ OHHL
Transcription of Exoenzymes and Carbapenem
Destroy Host Plant Structures to Release Nutrients
Kill Competing Bacteria
COO⁻

الشكل (١١,١١). تنظيم الإنزيم الخارجي وإنتاج مضاد كاربابينيم الحيوي في إلروينيا كاروتوفا بواسطة أسَل هوموسيستين لاكتون OHHL.

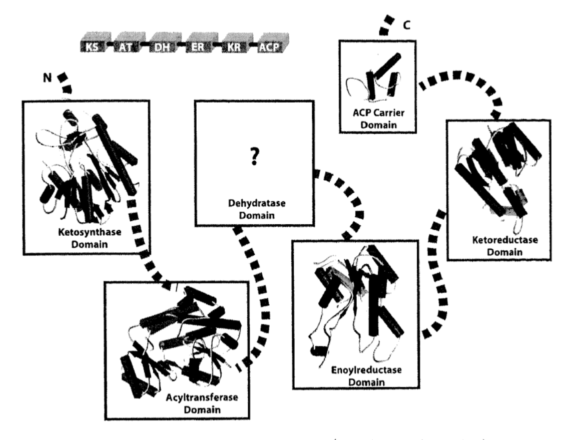


الشكل (١١,١٢). تتالي مزدوج لنصاب الإشارة إن – أسيل هوموسيستين لاكتونات في الزائفة الزنجارية.

وجزيء نصاب-الاستشعار الثالث في الزائفة الزنجارية تم وصفه في الآونة الأخيرة ككيان تركيبي متميز، ٢-هيبتيل-٣-هيدروكسي-٤- كوينولون (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone)، الناشئ من أنثرانيليت (anthranilate) و المانح ٣- كيتو-ديكانويل أسيل (3-keto-decanoyl-acyl donor) (كالفي وآخرون Calfee *et al.*, 2001). وهذا الكوينولون الزائفي هو جزء من استشعار-النصاب الهرمي ويتحكم في البناء الحيوي للعديد من عناصر الفوعية، لذلك منع بنائه الحيوي أو عمله قد يكون خطة مضادة للزائفة.

الموجز

تعدُّ لاكتونات *N*- أسيل هوموسيستين من بكتيريا إروينيا، الزائفة، وغيرها العديد من البكتيريا (تشودير وباسلير Schaudler and Bassler, 2001) و γ- بيوتاريولاكتونات من المتسلسلات التي ذكرت أعلاه، تخدم أغراضاً مكافئة، كفرمونات ذات — وزن - جزيئي - منخفض لإيصال الإشارات المعتمدة على - كثافة السكان بين البكتيريا من النوع نفسه. وتشترك في نفوذية الغشاء والأعمال مثل تفعيل الريبطات لعناصر الانتساخ النوعية، بينما تبنى النوعية (الخصوصية) عند مستوى تمييز مستقبل - الربيطة. وسوف نلاحظ مجموعة ثالثة من ربيطات خارج الخلية، الببتيدات الصغيرة في سلالات المكورة العنقودية الذهبية، في الفصل الخامس عشر التي تجسد منطق مقارن للاتصال من الظروف الخارجية على النمو ودائرة إنتاج المضاد الحيوي في البكتيريا. ونظم الإشارة هذه سبب للتحكم في جميع الأصناف الرئيسة لجينات البناء الحيوي للمضاد الحيوي.



الزخارف التركيبية في الحقول المحفزة والناقلة في خطوط تجميع بوليكيتيد سينثيتاز

الفصل الثاني عشر

البناء الحيوي لمضادّات بوليكيتيد (متعدد الكيتيد) الحيوية: مبحث إنزيمات خط- التجميع

POLYKETIDE ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS: ASSEMBLY-LLINE ENZYMOLOGY

المميزات العامة لبوليكيتيد سينثازات والمقارنة مع سينثازات الحامض الدهني

توجد الجينات التي تشفر منتجات بوليكيتيد الطبيعية في مجموعات، ويفترض أنها تسهل تنسيق التنظيم وتحريض الإظهار لجميع مكونات البروتين المطلوبة للعديد من الخطوات في مسارات البناء الحيوي المتخصصة هذه، عندما تستقبل وتحول عبرياً الإشارة المناسبة، للأنواع التي ذكرت في الفصل الحادي عشر. وتجتمع الجينات البنائية الحيوية كذلك مع مضخات التصدير وأي جينات مانحة للمقاومة أخرى وكما ذكر في الفصل السابع، لتبدأ تشغيل آليات الحماية - الذاتية في الوقت نفسه. ويوصى بالمراجع الشاملة بواسطة (رولينجز Rawlings, 1999، رولينجز Rawlings, 2001 a، رولينجز Rawlings, 2001 b) للتحليل الكامل لكل من النوع I والنوع II من بوليكيتيد سينثازات. وهذه المراجع كذلك تسمح بالدخول إلى الأدبيات الضخمة حيث ناقشت المسارات الكيميائية للبناء الحيوي لأصناف المنتجات الطبيعية في الفصول من الثاني عشر إلى الفصل الرابع عشر التي العمل بها، متيحةَ إطار العمل الذي سمح بتفسير وظيفة كل حقل بروتين مع الخطوات الكيميائية المعينة في خطوط تجميع متعدِّدة الوحدات بمجرد أن أصبحت تسلسلات الجين متاحة.

الكيمياء الممارسة بواسطة بوليكيتيد سينثازات ((polyketide synthases (PKSs)) موازية بشكل مقارب لتلك في إنزيم حامض الدهن سينثازات (fatty acid synthases) (FASs)، الذي تمت دراسته بشكل مستفيض لعقود لفك آليات وتنظيم ولقد قدمت سوابق لفهم منطق PKS. كل من إنزيمات PKSs وFAS تحول السلسلة القصيرة لثيوإيسترات أسيل -S –CoA إلى منتجات أسيل- طويلة – السلسلة بواسطة سلسلة من دورات الإطالة المتكررة التي تضيف اثنين من (FAS,PKS) أو ثلاثة وحدات كربون (PKS) لكل دورة إطالة (انظر شين Shen, 2000). قوالب البناء التي تستعمل لبدء السلسلة في FAS عادة هي أسيتيل-CoA (acetyl-CoA)، في حين أن قوالب البناء للإطالة غالباً

تكون مالونيل–CoA (malonyl-CoA). وحدات أسيل للبدء في PKS يمكن أن تكون تشكيلة أكثر تنوعاً من مجموعات أسيل، وتشمل أسيتيل، مالونيل، مالوناميل (malonamyl)، بروبيونيل (propionyl)، بيوتيريل (butyryl)، سيكلوهيكسيل (cyclohexyl)، بينزويل (benzoyl)، و٣–هيدروكسي–٥–أمينو بنزويل (الشكل ١٢,١). أثناء تمديد السلسلة، تستعمل معقدات FAS مالونيل–CoA في حين أن محفزات PKS عادة ما تصنع خيار واحد أو أكثر لقوالب البناء في كل دورة إطالة، مالونيل– أو ميثيل مالونيل–CoA (methylmalonyl-CoA) (الشكل ١٢,١). ونادراً، يمكن أيضاً أن يستخدم إيثيل مالونيل وميثوكسي مالونيل–CoAs (methoxymalonyl) كوحدات مد. وكما لوحظ أدناه، فنزع الكربوكسيل (decarboxylation) من وحدات مد مالونيل أو ميثوكسي مالونيل هو ميكانيكياً ملزم لإطالة السلسلة، وهكذا يؤدي مالونيل–CoAs إلى مد السلسلة بواسطة ٢ كربونات بينما يضيف ميثيل مالونيل CoAs وحدة C_3- ميثيل متشعبة (C_3-methyl branched unit).

في حفّازات FAS و PKS تُوجد حقول متعدِّدة أو وحدات فرعية تشارك في خطوات نوعية لبدء السلسلة، الإطالة والإنهاء. وعندما تُجمع الحقول في *cis* كجزء من وحدات فرعية كبيرة، ومتعدِّدة الحقول، تسمى أنظمة PKS النوع I. وعندما تتناثر (تتبعثر) حقول البروتين الحفّاز والناقل كوحدات فرعية منفصلة، في ترانس *(trans)*، التي تتزامل مؤقتاً وتتفكك في كل دورة محفزة، فتسمى هذه النوع II سينثازات (type II synthases). وسوف نفحص أولاً النوع II سينثازات، في الفصل التالي، لأنها تأتي في قطع منفصلة وتسلط الضوء نحو دور الحقول الفردية التي يتم جمعها في خطوط تجميع نموذجية لسينثازات من النوع I.

A

SCoA, SCoA, H₂N SCoA, SCoA, SCoA, SCoA, SCoA, OH H₂N SCoA

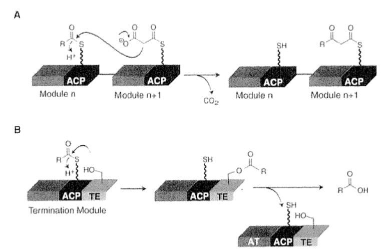
B

SCoA, SCoA

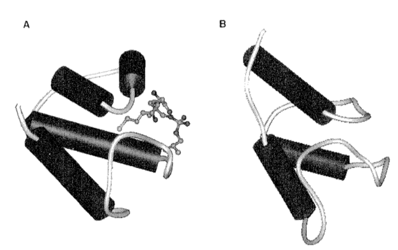
الشكل (١٢,١). قوالب البناء لـ (A) دورات البدء و(B) الإطالة بواسطة خطوط تجميع PKS.

الخاصية المركزية لكل من حفَازات FAS و PKS هي أن موحودات أسيل -CoA المفعلة ديناميكياً وحرارياً (thermodynamically) والتي تخدم كل من بدء السلسلة وإطالة السلسلة تحوَل إلى وسائط إنزيم -أسيل- S (acyl-S-enzyme)

وكيمياء تشكيل الرباط-C-C (C-C bond forming chemistry) في كل دورة من إطالة السلسلة (الشكل ١٢،٢ A) تحدث على إنزيمات أسيل-S المربوطة تساهمياً. وبعد عدد مناسب من دورات الإطالة عند إنتاج الطول-الكامل لسلسلة أسيل، يكسر ارتباطها التساهمي نحو إنزيم S بواسطة حقل محفز متخصص لإنهاء السلسلة (النوع I) أو وحدة منفصلة (النوع II) تسمى ثيوإستيراز (thioesterase) (TE) (الشكل ١٢،٢ B). الثيول (thiol) المقيد على الإنزيم في جميع وسائط إنزيم أسيل-S يتم توفيره بواسطة مجموعة فوسفوبانتيثين البدلية (phosphopantetheine prosthetic group) ذات الطول -Å – 20 التي أُدخلت بعد الترجمة على سلسلة سيرين نوعية جانبية في الحقل ٨ – ١٠ kDa/ الوحدة الفرعية المسمى بروتين حامل الأسيل (acyl carrier protein) (ACP) (انظر الشكل ١٢،٣ A و B).

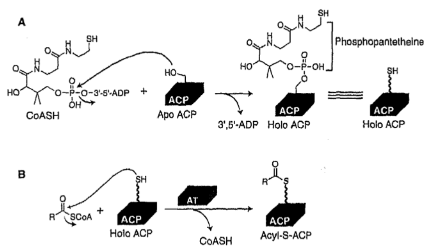


الشكل (١٢،٢). (A) إطالة السلسلة و (B) الخطوات الكيميائية فنهاء السلسلة في خطوط تجميع PKS.



الشكل (١٢،٣). تركيب حقول بروتين أسيل الناقل من (A) كامل حقل ACP للعصية الهشة FAS، مع مجموعة فوسفوبانتيثينيل البديلة المبينة في التمثيل بالكرة والعصا، (B) الشكل apo ACP لأكتينورودين سينثيتاز من المتسلسلة كوليكولر.

وهكذا فحقل ACP هو ناقل البروتين غير الحفّاز لسلسلة أسيل النامية ، والمحاطة بمجموعة من الحقول الحفّازة المكرّسة ، إما في *cis* (النوع I) أو في *trans* (النوع II). قبل عملية فوسفوبانتيثينيليشن (phosphopantetheinylation) ، بواسطة الإنزيم المعدّل المعروف بفوسفوبانتيثينيل ترانسفيراز (phosphopantetheinyltransferase) (PPTase) (لامبالوت وآخرون (Lambalot *et al.*, 1996)، والبروتين الناقل في الشكل غير الفعال (apo form) (الشكل ١٢,٤ A). بعد التعديل ، ذراع HS- بانتيثينيل (HS-pantrtheinyl (HS-pant)) من CAP الكامل هو كيميائياً مؤهل ليخدم كموضع تحميل لمجموعة أسيل التي أحضرت كأسيل-CoA ثيوإيسترات (acyl-CoA thioesters) بواسطة عبرترانسثيوليشن (transthiolation) عن طريق الفعل المحفز لحقل أسيل ترانسفيراز ((acyltransferase (AT)) (الشكل ١٢,٤ B) أثناء بدء السلسلة وللسلسلة النامية أثناء دورات الإطالة.

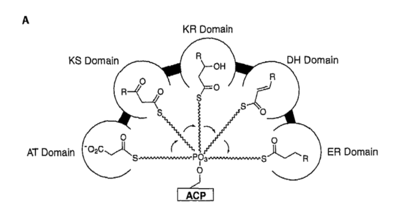


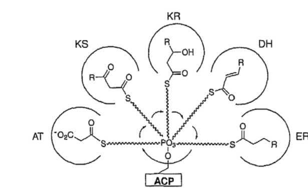
الشكل (١٢,٤). حقل البروتين الناقل لأسيل (A) التحويل الكامل لـ apo بواسطة التمهيد بعد الإنتساخي مع فوسفوبانتيثين، (B) توجيه holo HS-ACP مع مجموعات أسيل بواسطة ترانسثيوليشن (transthiolation) عن طريق تحفيز حقل AT.

في النوع I لمعقدات FAS و PKS سوف تكوّن حقول ACP كاملة ومتعدّدة في خط التجميع ، وتشمل سلسلة الإطالة تغيير موضع سلسلة أسيل النامية من أعلى تيار إلى اتجاه تيار المطبّعات (modules) ، مع كل ACP كامل تخدم كمحطة تحميل (الشكل ١٢,٥ A). وتوجد في النوع II لمعقدات FAS و PKS ، وحدة ACP فرعية واحدة ، وبنيت سلسلة أسيل بواسطة دورات تكرارية من الإطالة بينما تظل مربوطة تساهمياً مع نفس سقالة بروتين ACP (الشكل ١٢,٥ B).

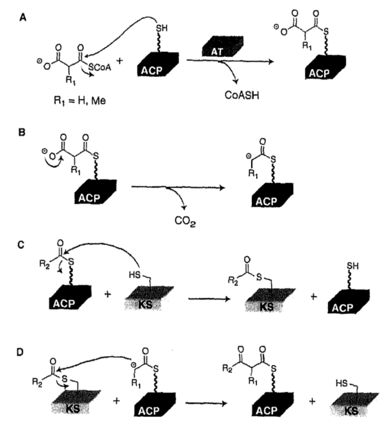
الخطوات الكيميائية التي نفذت بواسطة صفوف FAS و PKS هي نفسها. أولاً ، يحمّل مالونيل- أو موحود ميثيل مالونيل-CoA على حقل HS-pant-holo ACP بواسطة ترانيثيوليشن (transthiolation) تحت حماية حقل AT

لينتج مالونيل- أو ميثيل مالونيل S-ACP (الشكل ١٢،٦ A). وهذا acyl-S-ACP سوف يخدم ككربون أليف النواة، عندما يخضع إلى نزع الكربوكسيل (دي كربوكسيليشن) (decarboxylation) ليعطي C_2- كاربانيون المستقر المكافئ (C2-stabilized carbanion equivalent)، الممكن بواسطة ربط الثيوإيستر (الشكل ١٢،٦ B) في خطوة تكوين الرابط C-C bonding. يتم توفير مانح الأسيل الأليف الإلكترون لرابط C-C بواسطة مجموعة أسيل التي رسَيت مؤقتاً كوسيط إنزيم أسيل-إس (acyl-*S*-enzyme intermediate) عند الموقع النشط للحقل كيتوسينثيز (KS) أو الوحدة الفرعية (الشكل ١٢،٦ C). ويربط وسيط أسيل التساهمي هذا مع الموقع النشط سيستين لحقل KS وينشأ بواسطة تفاعل ترانسثيوليشن (transthiolation reaction) مماثل. وتحفز خطوة تكوين رابط C-C بواسطة حقل KS الذي يحرض نزع الأسيل من مالونيل- أو- ميثيل مالونيل (methylmalonyl-*S*-ACP) وينقل سلسلة الأسيل من الموقع النشط- سيستين إلى C2 كاربانيون/إينوليت (C_2 carbanion/ enolate) (الشكل ١٢،٦ D). وسواء حدث نزع الكربوكسيل (ديكربوكسيليشن) أولاً أو اقترن في نفس حالة الانتقال نحو تكوين رابط C-C لم يؤكد بالكامل. والنتيجة هي منتج *β*-keto-*S*-ACP (حيث جاءت التسمية كيتوسينثاز) حيث منبع سلسلة أسيل قد انتقل إلى نحو acyl-*S*-ACP أثناء إطالة السلسلة.



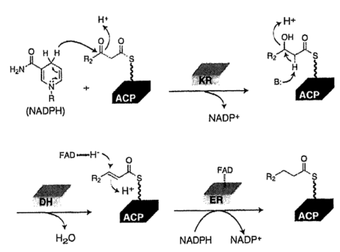


الشكل (١٢،٥). تفاعلات ACP (A) في نوع I PKS وFAS، داخل كل وحدة قياسية، (B) في نوع PKS وFAS، بين الوحدات الفرعية المنفصلة.



الشكل (١٢,٦). أربع مراحل تكوين رابط C-C لخطوات إطالة السلسلة لتجميعات PKS وFAS: (A) تكوين مالونيل أو ميثيل مالونيل– S-ACP، (B) نزع الكربوكسيل لتوليد الكربون أليف النواة، (C) المانح acyl-S-Cys-KS، (D) المنتج β-keto-acyl-S-ACP.

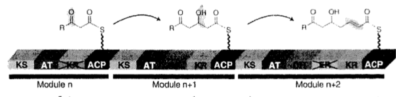
الخطوات الإنزيمية الثلاثة التالية، المقدمة في *cis* (النوع I) أو في *trans* (النوع II)، يتضمن صافي إختزال أربعة – إلكترون من β-keto كل الطريق إلى مجموعة بيتاميثيلين (β- methylene) في البناء الحيوي للحمض الدهني. وفي تحفيز FAS تأسست هذه لتحدث بواسطة الفعل التتابعي لحقول/الوحدات الفرعية كيتوريدكتيز ((ketoreductase (KR)، ديهيدراتيز ((dehydratase (DH)، وإينويل ريدكتيز ((enoyl- reductase (ER)، بالترتيب (الشكل ١٢,٧). يستعمل الحقل الحفّاز KR، NADPH ليختزل الكيتون إلى مستبدلات بيتا–هيدروكسي. وبالإمكان استخراج ألفا–هيدروجين الحامضي من β-OH-acyl-S-ACP بسهولة في الموقع النشط DH ليشرع في التخلص من مجموعة OH ينتج αβ-enoyl-S-ACP. ويمكن فيما بعد لهذه الرابطة المزدوجة المقترنة أن تختزل بواسطة إضافة بروتون–هيدريد من الإنزيم المشارك المختزل فلافين (flavin coenzyme)، $FADH^-$ في الموقع النشط لـ enoyl-S-ACP reductase، مع إضافة هيدريد إلى C_β لينتج $-C_\alpha H_2\ C_\beta H_2$ المشبع بالكامل ذات اثنين – كربون وحدة باسطة.



الشكل (١٢,٧). ثلاث–مراحل لإختزال أربع– إلكترون من مجموعة بيتا–كيتو: العمل التعاقبي لحقول KR,DH و ER.

مع تسلسل عمل دورة الإطالة FAS كمرشد، بالإمكان تحليل دورات PKS بشكل مماثل. وتقدم الوحدة القياسية النمطية من النوع I المزيد من تنوع المجموعة الوظيفية في تراكيب المنتج النهائي بواسطة النضج غير الكامل لوحدات الإطالة عندما يكون حقل KR ,DH أو ER غير وظيفي. تحصل إطالة السلسلة، ولكن حالات الأكسدة الوسيطة تستمر ويمكن تحويلها إلى مصب الوحدة النمطية التالية. وكما يظهر في الشكل (١٢,٨) للثلاث وحدة قياسية الافتراضية نوع PKS I، هناك خلل في حقل KR للوحدة النمطية *n* سوف يترك كربون بيتا في حالة أكسدة كيتو (keto ozidation state). وفي النمط $n + 1$ يترك الخلل عند الموقع النشط لحقل DH بيتا كربون للوحدة C_2 التي أُدخلت في تلك الدورة كبيتا —OH. وأخيراً، الخلل في حقل ER للنمط $n + 2$ سيسمح لـ $\alpha\beta$-ene بالبقاء. الفعل الحال للماء لحقل TE ليحرر سلسل أسيل ثمانية – كربون من ACP_{n+2} سوف ينتج سلسلة بوليكيتيد العالية الوظيفة. وهكذا فإن الفرق الرئيس بين FAS وخط تجميع النوع PKS I هو خسارة الوظيفة في واحد أو أكثر من حقول التكيف (الخياطة) في النمط PKS المُعطى. وحيث ثلاث دورات من الإطالة بواسطة خط تجميع PKS سوف تنتج أوكتانويت (octanoate) المشبع بالكامل، المنتجات الطبيعية PKS قد أوقفت عند مراحل متوسطة من اختزال مجموعات بيتا–كيتو التي تنشأ في كل دورة تكثيف، وبذلك يسمح للكيمياء التالية وخواص التمييز الجزيئي لصنف هذا المنتج الطبيعي.

وبإمكان معقدات النوع PKS II أن تظهر كذلك تغييرات مثيرة في كل من حالات الأكسدة للوحدة الباسطة وعدد من التراكيب الحلقية عندما يطلق منتج بوليكيتيد النهائي. وكما سنلاحظ في القسم التالي، فإنه من المحتمل بأن تحدث تراكيب حلقية متعدِّدة من البوليكيتيد العطري من متوسطات بوليكيتيد بدون اختزال جوهري لمجموعات بيتا–كيتو المتعدِّدة في متوسطات acyl-*S*-ACP.



الشكل (١٢,٨). فرضية ضبط الأكسدة غير الكامل في ثلاث دورات من خط تجميع PKS.

النوع II من تنظيم بوليكيتيد سينثازات: تتراسيكلين، تتراسينوميسين (tetracenomycin)، وكتل البناء الحيوي لدونوربيسين وعمل سيكلازات (cyclases)

الحلقات الأربع لعائلة مضادّات تتراسيكين الحيوية، مثل أوكسيتتراسيكلين (oxytetracycline) وكلورتتراسيكلين (chlortetracycline) (الشكل ١٢,٩)، وكذلك تتراسينوميسين والمضاد الحيوي المضاد للورم دوكسوروبيسين (doxorubicin) (الشكل ١٢,٩) تنتج بواسطة النوع II بوليكيتيد سينثازات إضافة إلى بعض الإنزيمات العطرية أروماتازات (aromatases) وسيكلازات كذلك تظهر في الكتل (المجموعات) (الشكل ١٢,١٠) (انظر تشين ٢٠٠٠، للمرجع الأخير عن PKS العطرية). تختلف مجموعة أوكسيتتراسيكلين (oxytetracycline) عن تجميعة كانونيكال (canonical assembly) بواسطة امتلاكها مجموعتين من الجينات، الأدنى الوحدات الفرعية الثلاث من PKS وهي KS_α،KS_β ، KS_β تعرف كذلك بالوحدات الفرعية CLF (chain length factor) (عنصر طول السلسلة)، وACP في ترادف، ومن ثم KP و أوماتيز ثنائي الوظيفة/ سيكلاز يبعد بعض 10 kb عنه (انظر بيتكوفيك وآخرون Petkovic *et al.*, 1999). النوع I PKS الأدنى في هذا وفي الأنظمة ذات العلاقة، مثال، البناء الحيوي لأكتينورودين (actinorhodin) بواسطة المتسلسلة كوليكولر (هوبوود Hopwood, 1997، خوسلا Khosla, 1997)، يُعتقد بأنه يستعمل زوج KS_α / KS_β من الوحدات الفرعية كمثنوي وظيفي، ربما مع الوحدة الفرعية بيتا المختلة تحفيزياً التي تخدم جزئياً كـ CLF (عنصر طول السلسلة)، معدلةً عدد دورات مد السلسلة قبل حدوث التحليق (cyclization).

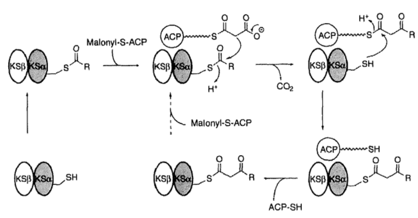
الشكل (١٢,٩). مضادّات بوليكيتيد تتراسيكلين العطرية الحيوية المتولدة بواسطة النوع PKS II: تتراسيكلين، أوكسيتتراسيكلين، كلورتتراسيكلين، تتراسينوميسين و دوكسوروبيسين.

Gene:	dspG	dspH	dspF	dspE	dspA	dspB	dspC	dspD
Enzyme:	ACP	CYC	ARO/CYC	KR	KS	CLF	KS	CLF

SCoA + SCoA → DspC/D/G (Minimal PKS) → S-DspG → 8 x SCoA, DspA/B/G (Minimal PKS) → S-DspG → DspE (KR) → HO … S-DspG → DspF (ARO/CYC) → S-DspG → Doxorubicin

الشكل (١٢,١٠). التنظيم الوحدات لــ PKS الذي ينتج مضاد تتراسيكين العطري دوكسوروبوسين.

يوفر الشكل الكامل (holo form) من HS-pant-ACP الثيول (thiol) حيث يتجمع مالونيل —S-ACP الأول بينما تُحمَل وحدة أسيل البادئة فوق الومقع النشط سيستين ثيول من الوحدة الفرعية KS_α. بعد ذلك يحفز KS المؤسَل مالونيل ديكربوكسيليشن وينقل أسيل نحو انيون إينوليت (enolate anion) النامي لينتج β-keto-acyl-S-ACP ويجدد KS سيستين ثيوليت (KS cystein thiolate) لدورة الإطالة التالية (الشكل ١٢,١١). ومن الضروري نقل السلسلة ثانيةً نحو KS الموقع النشط سيستين لتسمح لتكرار آخر لتكوين رابط C-C المحفز هذا ودورة الإطالة (تظهر بواسطة إضافة مالونيل —S-ACP في وسط الشكل).



الشكل (١٢,١١). دورات إطالة السلسلة المتكررة لنوع PKS II و FAS.

في البناء الحيوي لدونورويبيسين أو دوكسورويبيسين ، الوحدة البادئة هي بوريبونيل CoA (propionyl-CoA) وجميع الوحدات الباسطة هي مالونيل –CoA. وبعد تسع دوات تكثيف يبنى ديكاكيتيديل– S-ACP (decaketidyl-S-ACP) (الشكل A١٢،١٢)، حيث يعتقد بأن جميع مجموعات بيتاكيتون العشرة تبقى بدون تعديل اختزالي في سلسلة أسيل. وبشكل مشابه ، يستعمل أوكسيتتراسيكلين سينثيتاز نصف الأميد التابع مالونيل -CoA، مالوناميل -CoA، كوحدة بادئة وثمانية مالونيل -CoA كوحدات باسطة لبناء ١٩-كربون–سلسلة نوناكيتيديلS-ACP (nonaketidyl-S-ACP) كسلسلة أسيل كاملة الطول قبل التحليق (الشكل B ١٢،١٢). الوحدة البادئة تتراسينوميسين هي أسيتيل -CoA، وبعد إضافة تسع وحدات مالونيل -CoA، يجري ٢٠–كربون نوناكيتيديل إنزيم –S (20-carbon nonaketidyl-S enzyme) (الشكل C ١٢،١٢) دورتان من إغلاق الحلقة متواسطة – بسيكليز (cyclase-mediated). سيكليز الأول ، TcmN، يغلق ثلاث حلقات ليصنع TcmF2 ، ويغلق TcmI الحلقة الأخيرة ليعطي نظام الحلقات – الأربع المدمجة المشابهة لهيكل تتراسيكلين. الإنزيمات المخيطة لبعد -PKS/سيكليز تؤمثل أحد مجموعات فينوليك OH ومجموعة COOH ومن ثم تستعمل إنزيم اكسيجينيز (oxygenase) ، TcmG ، لتدخل مجموعات الثلاث هيدروكسيل في تتراسينوميسين C ، الذي ربما ينشأ من الأكسجة – الأحادية (mono-oxygenation) للحلقة A ومن ثم epoxidation وفتح التحليل المائي لإيبوكسيد (epoxide) عند وصلة (مفصل) حلقة A / B (انظر هتشينسون Hutchinson, 1997 ، للمراجعة) (الشكل C ١٢،١٢).

عندما تطرد جينات أروماتيز وسيكليز (aromatase and cyclase genes) في كتل النوع PKS II هذه ، مختلة ، أو أن تكون غائبة ، ثم تبدأ أنماط التحليق الشاذة بمجرد أن إنزيمات بوليكيتونيك أسيل (polyketonic acyl enzymes) الفعالة تتكثف غير إنزيمياً لمختلف المنتجات الحلقية التي تُطلق من هيكل ACP. لا يعطي أحد من الطرق غير الإنزيمية أنظمة تتراسيكلين (tetracyclic systems) الطبيعية ، مما يدل على أن سيكلازات مهم في كلا الوضعين المشَكل الثنية المنتج لسلسلة بوليكيتونيك أسيِّل الحلقية ومن ثم تحفيز التحليق الموضعي النوعي والتجفافات إلى أنماط اتصال المنتج الطبيعي. تحتوي بعض كتل النوع II على سيكلازات متعدد ، مثال ، TcmN و TcmI في كتلة تتراسينوميسين (الشكل ١٢،١٢) و DpsF و DpsH في كتلة دونوروبوسين (الشكل ١٢،١٠)، ويفترض بأنها تميز مختلف التراكيب اللاّحلقية التحتية وتحفز عمليات التحليق جزئية (انظر هتشينسون Hutchinson, 1997 ، للمراجعة). الخطوط العريضة لإستراتيجيات تكوين رابط C-C ونقاط التدوير غير واضحة ، ولكن التوقيت وتفاصيل الخطوات ليست مدروسة جيداً إلى الآن. وعلى سبيل المثال ، في تكوين الأربع حلقات لهيكل تتراسيكلين ، يفترض بأن يطوي إنزيم نوناكيتيديل في القالب مثل روابط كاربون–كاربون أُنشئت بين C_{19},C_4 وC_{17} ، C_6 وC_{15} ، وC_8 و C_{13} (الشكل ١٢،١٣)، مع C_2,C_4,C_6 و C_8 تعمل كمكافئات لكاربانيون (أشكال رنين إينوليت) (enolate resonance forms) لمهاجمة الكيتونز عند C_{19},C_{17} وC_{13} ، بالترتيب ، لتوليد نظام الأربع–حلقات المندمج العطري (٦– ميثيل بريتيترامِيد) (6-methylpretetramid).

يجب أن تحدث التجفافات الآحقة والتعطير للحلقة على اليد اليسرى، عمليات إضافة الهيدروكسيل (hydroxylations)، ضبط الأكسدة والاختزال، الأمْيَنَة (amination)، والمَثْيَلة الثنائية (dimethylation) عن طريق سلسلة من الإنزيمات الحائكة لتنتج أوكسيتتراسيكلين النهائي من طليعة هذا التتراسيكلين (هتشينسون وفوجي Huchinson and Fujii, 1995).

الشكل (١٢,١٢). متواسطات إنزيم بوليكيتيد-S: (A) دونوروبوسين سينثيتاز، (B) تتراسيكلين سينثيتاز، (C) تتراسينوميسين سينثيتاز.

الشكل (١٢,١٣). تفاعلات تكوين– الرابط في بوليكيتيد-S – تتراسيكلين سينثيزإنزيم أسيل.

في البناء الحيوي لدوكسوروبوسين يوجد اثنان من الكربونات الإضافية في طليعة ٢١- كربون ديكاكيتيديل- S-ACP (21-carbon decaketidyl-S-ACP) اللا حلقي، وبينما يجري له إغلاق للحلقات الأربع متواسط بسيكليز، يكون الوصل المؤسس مميز (الشكل ١٢،١٤ A)، مما يفترض هيئة مطوية مختلفة لسلسلة أسيل الآحلقية هذه. تحرض مكافئات الكاربانيون عند C_3,C_6,C_8 و C_{10} لتهاجم مع بموضعية نوعية الكيتونات الأربع عند C_{20},C_{19},C_{17} و C_{15}، بالترتيب، بينما تقمع جميع تفاعل التحليقات الجانبية غير الإنزيمية. ويبدو أن مُحلِقة DpsF (DpsF cyclase) يصنع الحلقات الثلاث الأولى (الشكل ١٢،١٤ B) ربما قبل فصل الارتباط لسلسلة أسيل من هيكل ACP. وعليه، DpsH (الشكل ١٢،١٤ C) ربما يُحلَق الحلقة الأخيرة، صانعاً بذلك الوصيلة C_3-C_{20} ومطلقاً سلسلة أسيل من ACP.

الشكل (١٢،١٤). البناء الحيوي لدوكسوروبيسين: (A) خطوات تكوين رابط C-C من قالب الإنزيم المرتبط، (B) تحليق الثلاث حلقات المتواسط بـــ DpsF، (C) عمل DpsH وتفاعلات بعد حياكة سينثيتاز (postsynthase tailoring reactions).

وإكمال المضاد الحيوي دوكسوروبوسين المضاد للورم يشمل الأكسجة عند C_{16} و C_{18} ليحدث نظام كوينون- هيدروكسيكوينون (quinone-hydroxyquinone system) الرديف في الحلقتين الوسطيين وارتباط بالغليكوزيل (glycosylation) لـ OH عند C_5 مع سكر أمينوديوكسي دونوسامين (aminodeoxy sugar daunosamine) غير العادي (هتشينسون Hutchinson, 1997) بواسطة الإنزيم الحائك المُرمِز بواسطة الجينات المجاورة لكتلة البناء الحيوي.

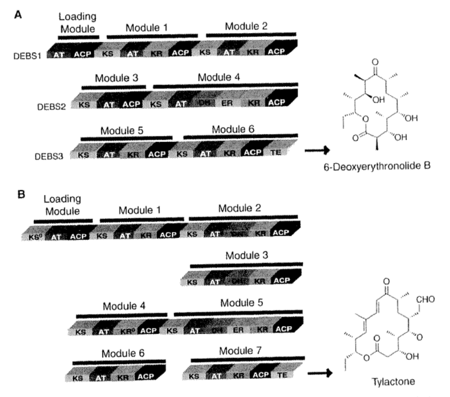
بينما الوحدات الفرعية الدنيا للنوع PKS II تبدو أن تكون KS_{α},KS_{β} و ACP، فلكتلة دوكسوروبيسين مجموعتان من KS_{α} و KS_{β}، DpsC/ DpsD و DpsA/ DpsB (الشكل ١٢,١٠)، والتي يُعتقد بأنها تعمل دورة التكثيف الأولى (C/D) ومن ثم الدورات الثمانية التالية (A/B). وعندما ترمّز الوحدات الفرعية KR في الكتلة، كما في كتل دوكسوروبوسين وتتراسيكلين، سوف يعمل KRs بنوعية موضعية وتجسمية. في مسار دوكسوروبوسين، يعتقد بأن اختزال كيتون C_{13} إلى C_{13}-OH يحدث قبل التحليق، وربما يكون مهماً لقالب السكان، التحليق الموجه، و/أو التجفاف والتعطير التالي. وكيف تُحمى سلسلة البوليكيتيد النامية والمحتوية على أسيل وتُفصل بمجرد نموها على الوحدة الفرعية ACP لم يفهم جيداً ولكن ستكون مهمة لإعادة التصميم المنطقي للتحليق في جهود البناء الحيوي التوافقية للنوع PKS II. وبالإمكان صنع هجين النوع II بوليكيتيد بواسطة تبادل قلب وحدات PKS الفرعية والإنزيمات المحلَقة (سيكلازات) (انظر خوسلا Khosla, 1997).

النوع I بوليكيتيد سينثازات: خطوط التجميع النمطية لإريثروميسين وتيلوسين

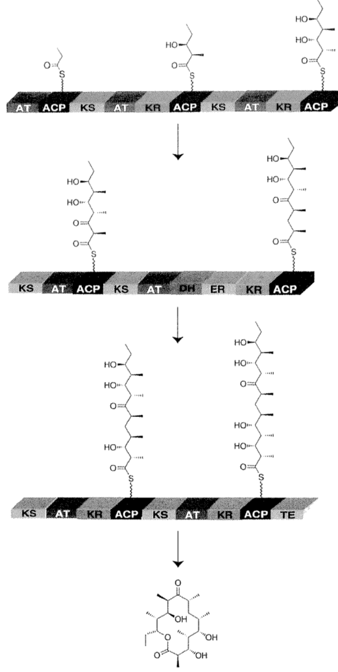
على النقيض من منطق الوحدة الفرعية المنفصل لمعقدات النوع PKS II و FAS، النوع PKS I و FAS هما نموذجان، مع العديد من الحقول المحفزة والبروتين الناقل متصلة مع بعضها ببعض في داخل الوحدات الفرعية العالية–الوزن–الجزيئي. الميكروليدز من صنف إريثروميسين يحتوي على العضوية –١٤ حلقات ماكرولاكتون في حين أن تيلوسين له ١٦ – عضو حلقات (الشكل ١٢,١٥)، وهي تعكس ست وسبع دورات إطالة، بالترتيب. وكان تنظيم النموذج البدئي (prototypic organization) لميكروليد سينثازات قد كُشف عندما تسلسلت الجينات التي ترمّز أجليكون ديوكسي إريثرونوليد بي (aglycone deoxyerythronolide B) (DEB) (كورتيز وآخرون Cortes *et al.*, 1990، دوناديو وآخرون Donadio *et al.*, 1991) وكشف كذلك عن ثلاثة بوليببْتيدات في المدى الوزن الجزيئي 200-kDa والتي تشكل معاً النشاط المحفز لـ DEB سينثيتاز (DEBs) محولاً البادئ بروبيونيل– CoA (propionyl-CoA) وجزيئات ٦– ميثيل مالونيل– CoA (6-methylemalonyl-CoA) الباسطة إلى DEB (الشكل ١٢,١٥ A). أظهر تفتيش الوحدات الفرعية DEBS1,DEBS2 وDEBS3، أن كل واحدة تحتوي على وحدات (نمائط) (modules) اثنين للإطالة (لست دورات من إضافات ميثيل مالونيل)، على أن يبدأ DEBS1 مع مزيد من تحميل الوحدة النمطية، وأن DEBS3 له حقل TE لإنهاء السلسلة عند نهايتها C (C terminus). ووحدة التحميل عند بداية الطرف-N (N-terminal) لـ DEBS1 لها AT وحقل HS-ACP لتثبيت وحدة بروبيونيل البادئة كروبيونيل —ACP-*S*.

الحقول المركزية في نوع النمط PKS I التي تشتغل في إطالة السلسلة هي KS,AT و ACP، عادة ما توضع في ذلك الترتيب، مع AT الذي يُحمل مالونيل أو مجموعة ميثيل مالونيل من مادة acyl-CoA على holo HS-ACP. وفي

DEBS1,2,3، الحقول AT في الأنماط ١ إلى ٦ هي خاصة لميثيل مالونيل. والموقع النشط KS سيستين ثيول يؤسل – ذاتياً (يحمضل) (self-acylayes) مع مجموعة أسيل المانحة، بينما ميثيل مالونيل– ACP-*S* على ديكربوكسيليشن هي الكاربون أليف النواة لتكوين *β*-keto-acyl-*S*-ACP، نفس المنطق كما رأينا أعلاه للنوع II لتكوينات الرابط C-C. وخلافاً لمنتجات بوليكيتيد العطرية الطبيعية، التي تمر بسلسلة من التحليقات (cyclizations) لتكوّن أنظمة– حلقة مندمجة عن طريق مجموعات بوليكيتونيك (polyketonic groups) في سلسلة أسيل الكاملة الطول، وربما تختزل مجموعة بيتا–كيتون في كل دورة لنوع PKS I، بواسطة حقول إضافية. وهكذا فالحقول المركزية KS,AT و ACP للنمط PKS ربما تتحد (توصل) بواسطة حقل KR (الأنماط ١ و٢)، الحقل DH (النمط ٤)، والحقل ER (النمط ٤). وبما أن الأنماط ١ ٢ تملك حقول KR، ولكن ليس حقول DH أو ER، فسلسلة أسيل كيتيدالثلاثية (triketide acyl cahin) التي تتراكم على ACP_2 من DEBS1 تمتلك ستبدلات C_3 و C_5-OH (الشكل ١٢,١٦).



الشكل (١٢,١٥). التنظيم النمطي لسينثازات لإريثروميسين وتيلوسين: (A) خط التجميع لإريثروميسين أجليكون-6-DEB، (B) خط التجميع للعضو- 16 أجليكون تيلاكتون.



الشكل (١٢,١٦). سلاسل أسيل متوسطة – الطول التي تتراكم على خط تجميع DEBS.

وتتحرك سلسلة أسيِّل النامية من DEBS1 إلى الوحدة الفرعية DEBS2، تمر على طول الأنماط ٣ و ٤، وتصل إلى محطة الإرساء HS-ACP عند نهاية DEBS2. ويملك النمط ٣ فقط القلب (المركز) KS-AT-ACP، وهكذا يظل الكيتون باقياً، بينما يملك النمط ٤ حقل الثالوث DH-ER-KR، وبذلك فبيتا كيتون التي أُدخلت حديثاً تختزل

على كل الطريق نحو β-CH_2. وفي DEBS3 النمط ٥ والنمط ٦ كل منهما له حقل KR فقط كحقل اختياري، وهكذا فمرة أخرى تبقى مجموعات β-OH في دورات الإطالة الاثنين هذه. من الطلب والاستبدال للحقول الثمانية والعشرين (١٠ في DEBS1، ٩ في DEBS2، ٩ في DEBS3) في خط تجميع الوحدات الفرعية-الثلاث، يمكن لحد التنبؤ بالطول والتوظيف لكل كربون في ١٥-كربون-سلسلة أسيل الآحلقية (15-carbon-long acyclic acyl chain) وأنماط الأمثلة عند $C_{2,4,6,8,10,12}$ من مجموعات ميثيل مالونيل الستة. الكيمياء التجسمية لمستبدلات هيدروكسي الأربعة تراقب بواسطة الكيمياء التجسمية لـ KR في الأنماط ١ و ٢ و٥ و٦.

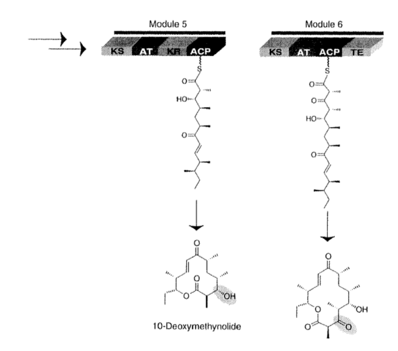
المهمة المتبقية لـ DEB سينثيتاز هي لفصل مجموعة أسيل كاملة – الطول الناضجة والتي رُسَيت عند محطة الطريق السابعة وACP الأكثر طرفية، في النمط ٦. وفقط عند مصب ذلك الـ ACP يوجد الحقل الثامن والعشرون والأخير لخط التجميع، الحقل TE. وهو يعمل كإنزيم مُحلِق (cyclase)، يُحفز القبض بين الجزيئي لثيوإستر كربونيل C_1 (C$_1$ thioester carbonyl) بواسطة مجموعة C_{13}-OH، منتجاً ١٤-عضو ماكرولاكتون ٦- DEB بمجرد توليد -HS ACP الحر وأن يصبح خط تجميع DEBS طليقاً لدورة محفزة أخرى (الشكل ١٢،١٧). سوف نلاحظ أدناه خطوات الحياكة الإنزيمية الآحقة لـ ٦- ديوكسي إريثرونوليد (6-deoxyerythronolide) الخالية من نشاط المضاد الحيوي، لتحول إلى المضاد الحيوي المؤكسج والكربوهيدراتي (oxygenate and glycosylated antibiotic).

الشكل (١٢،١٧). إطلاق سلسلة أسيل الناضجة من النمط الأخير بواسطة حقل DEBS3 TE الذي يعمل كمحلِق لينتج ماكرولاكتون DEB -6.

هناك اهتمام في هندسة خطوط تجميع PKS ليمنح حلقات ماكرولاكتون من أحجام مختلفة. في بيكروميسين PKS (pikromyci PKS) (إكزو وشيرمان Xue and Sherman, 2001)، لوحظ إطلاق كل من ١٤-عضو ماكرولاكتون الطبيعي (ناربونوليد) (narbonolide) و١٢-عضو لاكتون الأقصر (١٠-ديوكسي ميثينوليد) (10-deoxymethynolide) (الشكل ١٢،١٨)، مما يعكس المنافسة بين التحليق من النمط ٦ (إلى الحلقة ١٤) والتحليق المبكر للسلسلة النامية على النمط ٥ (الحلقة ١٢). والتمييز الإضافي بين الحلقة-١٢ والحلقة-١٤ لاكتونات هي أن النمط الخير، الذي

يثبت الكربون ١ و ٢ ، لا يملك KR وبذلك يترك C_3 كيتا لاكتون غير مختزل الذي يصبح C_3 كيتون في ناربونوليد وفي منتجه ١٠-هيدروكسي-٥-ديسوسامينيل (10-hydroxy-5-desosaminyl)، بيكروميسين. وبقاء هذه المجموعة ٣- كيتو يجعل بيكروميسين كيتوليد طبيعي، كمناظرة للميكروليدات واسعة-المدى في التطوُّر السريري (الشكل ١٠,٤). ولا يُحرض بيكروميسين، Erm rRNA methyltransferases وبذلك لا يُحرض النمط الظاهري لمقاومة ماكروليد-لينكوساميد-ستربتوجرامين B (الفصل العاشر) (انظر إكزو وشيرمان Xue and Sherman, 2001).

وبشكل مماثل، فطفرة الفطر سكاروبوليسبورا إريثري *(Saccharopolyspora erythrae)* وُجد أنها تصنع بعض حلقة منتج العضو-١٦ جنباً إلى جنب مع الحلقة-١٤ ديوكسي إريثرونوليد B في الطفرة. ويعزى دور دورة الإطالة الإضافية إلى النقل البطيء لسلسلة النامية من النمط ٤ إلى النمط ٥، مما يتيح وقتاً لإطالة إضافية على النمط ٤ (ويليكنسون وآخرون Wilkinson *et al.*, 2000). وإذا كان بالإمكان هندسة مثل هذه التفاعلات الجانبية لتصبح تدفقات رئيسة للمنتجات مازال يتعين تحديده. إدراج نمط PKS من راباميسين سينثاز (rapamycin synthase) إلى داخل DEBS1 لصنع الثلاث – أنماط الوحدة الفرعية الباسطة، يتبعها الإظهار في *S.erythrae* أدى إلى إنتاج أوكتاكيتيد (octaketide) مع الحلقة العضوية -١٦، وإن كان عند كفاءة ٣-٥ ٪ مقارنة بمستويات بوليكيتيد الطبيعية من نوع DEBS1-3- البري (روي وآخرون Rowe *et al.*, 2001).



الشكل (١٢,١٨). المنافسة على مقاسات حلقة ماكرولاكتون المختلفة في خط تجميع بيكروميسين: حلقة-١٦ ناربونوليد وحلقة-١٢ ١٠- ديوكسيميثينوليد بواسطة التحليق من النمط ٥ أو من النمط ٦، لاحظ وجود مجموعة C_3-keto في بيكروميسين.

لاحظ بأنه على النقيض من نوناكيتيديل–S-ACP (nonaketidyl-S-ACP) وديكاكيتيديل– ACP-S (decaketidyl-S-ACP) إنزيمات أسيل في تتراسيكلين ودوكسوروبوسين سينثازات، حيث تتراكم ثمانية وتسعة كيتونات، غير مختزلة، خلال دورات إطالة السلسلة، يملك DEBS كامل – الطول السباعي هيبتاكيتيديل ($heptaketidyl-acyl-S-ACP_7$) كيتون واحد فقط، مخفضاً بشكل كبير خيارات إقتران كليسن (Claisen) ومسارات التحليق العابر الحلقي (transannular cyclization pathways). الحقول الاختيارية KR,DH وER في هذا وغيره من خطوط تجميع PKS النموذجية، التي تعمل في *cis* بطريقة اقتران محكمة، لتعيد مسار مصير سلاسل أسيل نحو التحليل المائي أو macrolactonization (الشكل ١٢,١٧ و ١٢,١٨) بدلاً من تشكيلات حلقة كربون الحلقية (carbocyclic ring).

والنقيض الثاني بين النوع I والنوع II من PKSs هو عدد حقول ACP وأنماط تبديل مكان السلسلة النامية. في النوع II FASs و PKSs، تستعمل وحدة فرعية واحدة من ACP وسلسلة بيتا – كيتو أسيل النامية التي تنتج في كل دورة تكثيف/إطالة، يبدل مكانها ثانية إلى النشط KS الموقع– النشط سيستين لتُستعمل كمانح في الدورة التالية (الشكل ١٢,١١).

وسلسلة أسيل النامية هي دائماً على KS الموقع– النشط سيستين ثيول عندما تعمل كمانح لدورة الإطالة التالية و (ميثيل) مالونيل –ACP-S هو دائماً الكربون أليف النواة في نزع الكربوكسيل. وفي النوع PKS I النموذجي، يوجد واحد HS—ACP لكل نمط وتنقل السلسلة النامية غير اتجاهي من النهاية –N إلى النهاية –C خلال شلال من متواسطات acyl-S-ACP (الشكل ١٢,١٦). ويعمل (ميثيل) مالونيل– ACP-S ثانيةً ككربون أليف النواة تحت KS – المتواسط نزع الكربوكسيل.

التعديلات بعد – خط – التجميع: أكسيجينازات الأحادية (monooxygenases) وغليكوزيل ترانسفيرازات (glycosyl transferases)

كما لاحظنا في الفصل الرابع، العديد من مضادّات ماكروليد الحيوية هي كربوهيدراتية (غليكوزيليتيد) لتوفر تفاعلات رابطة الهيدروجين مع إبراز الريبوسوم 23S rRNA، بواسطة مخالطات سكر ديسوسامين (desosamine sugar) من إريثروميسين إلى A_{2058} (الشكل ٤,٥). وفي الحقيقة، فتفاعلات الحياكة بعد – خط – التجميع الأكثر شيوعاً للبوليكيتيدات التي صنعت كل من النوع I والنوع II من PKSs هي الأكسجة، التسكير، وأمثلة الذرات المتغايرة. ولقد لاحظنا الميثلة الثنائية (dimethylation) والأكسجة الثلاثية (trioxygenation) لتنهي مسار تتراسينوميسين (tetracenomycin) في نوع نظم II السابقة الذكر.

في ميثلات (methylations) – بعد – خط – التجميع ، يستعمل إس– أدينوسيلميثيونين (S-adenosylmethionine) (SAM) كمادة مشاركة مانحة للميثيل ، التي توفر CH_3^+ متكافئ للنيتروجين ، الأكسجين الليف النواة ، أو ذرة كربون (كاربانيون) في منتج بوليكيتيد الناشئ. وبعض عمليات ميثلات C (C methylations) عن طريق SAM تحدث بينما السلسلة النامية ما تزال على خط تجميع PKS.

في نضوج 6-DEB إلى إريثروميسين A توجد خمس خطوات إنزيمية : إضافة الهيدروكسيل مرتين عند C_6(EryF) وC_{12} (EryK)، تفاعلين لغليكوزيلترانسفيرازات التي تركّب L- ميكاروز (L-mycarose (EryBIV)) عند C_3-OH لماكرولاكتون لينتج ٣–ألفا–ميكاروسيلإريثرونوليد B (3-α-mycarosylerythronolide B) ومن ثم D- ديسوسامين (D-desosamine) (EryCII) عند C_5-OH لينتج إريثروميسين D. وأخيراً مثيلة O (O methylation) (EryG) عند 3-OH لسكر ميكاروسيل (mycarosyl sugar) يكمل البناء الحيوي لإريثروميسين A (الشكل ١٢,١٩) (كاتز Katz, 1997). يعمل EryF هيدروكسيلاز (EryF) hydroxylase على 6-DEB في حين يعمل مونوكسيجينيز EryK (monooxygenase EryK) عند C_{12} فقط بعد إضافة كلا السكرين. وكل هيدروكسيلاز يعدُّ عضواً في عائلة سيتوكروم P450 مونوأكسيجينيز المحتوي على–الهيم (مركب البورفورين الحديدي) (heme-containing cytochrome P450 monooxygenase) ، نموذجياً للعديد من محفزات أكسجة المضاد الحيوي. والجينات الخمسة أعلاه لإنزيمات الحياكة هذه توجد في مجموعة جين البناء الحيوي لإريثروميسين، المشيرة إلى الوظيفة الأيضية المكرسة لها، وتمكن على التنظيم المنسق. في بيكروميسين، حيث الموضع–٣ هو الكيتون ، لا يوجد ارتباط بالغليكوزيل عند المكان. ويوجد فقط إنزيمان للنضوج في المجموعة : سيتكروم P450 PikK وهو ١٠ –هيدروكسيلاز وديسوسامينيل ترانسفيراز desosaminyltransferase (إكزو وشيرمان Xue and Sherman, 2001). وفي الكيتوليدات الأخرى ، مجموعة واسعة من كيمياء بعد – التجميع المؤكسدة ستتبعها ، وتشمل اقتران الحلقة العطرية والفينوليك وعمليات توليد الملح (halogenations).

يتطلب وجود السكر على حلقات ماكرولاكتون لنشاط المضاد الحيوي كنتيجة لتوفير محددات رئيسة للربط لتمييز 23S rRNA على الوحدة الفرعية للريبوسوم 50S. وبشكل مماثل ، في مسار دونوروبوسين/دوكسوروبوسين ، يعدُّ سكر L- دونوسامين (L-daunosamine sugar) (الشكل ١٢,٩) العنصر الأساسي للفعاليّة الحيوية. وتلتصق السكريات بمضادّات البوليكيتيد هذه وكذلك بالمضادّات الحيوي المستندة على – البِبْتيد التي شرحت في الفصل التالي التي غالباً ما تكون سكريات ديوكسي و / أو أمينو غير عادية والتي توجد فقط كمكونات للمضادّات الحيوي (ليو وثورسون Liu and Thorson, 1994). وبدورها ، الجينات التي ترمِّز بنائها الحيوي توجد كذلك متكتلة مع بقية البناء الحيوي للمضاد الحيوي وجينات المقاومة مع غليكوزيلترانسفيرازات معين (للمراجعة ، انظر ثورسون وآخرون Thorson *et al.*, 2001).

6-Deoxyerythronolide B → (C-6 Erythronolide B Hydroxylase) → Erythronolide B → (TDP-Mycarose Glycosyltransferase) → 3-*O*-Mycarosyl-Erythronolide B → (TDP-Desosamine Glycosyltransferase) → Erythromycin D

Erythromycin D → (C-12 Hydroxylase) → Erythromycin C

Erythromycin C → (*O*-Methyltransferase) → Erythromycin A

Erythromycin D → (*O*-Methyltransferase) → Erythromycin B

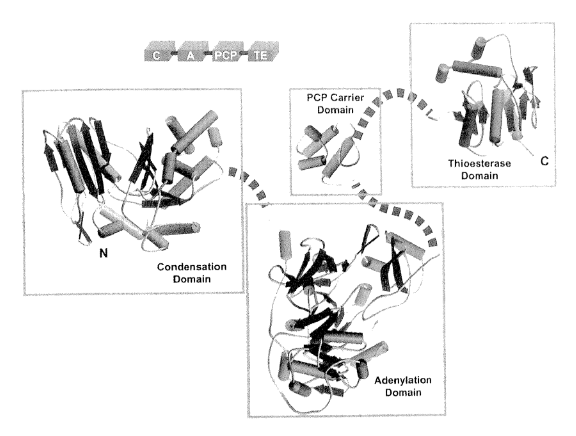
Erythromycin B → (C-12 Hydroxylase) → Erythromycin A

الشكل (١٢,١٩). الخطوات الإنزيمية الخمس لتحويل 6-DEB إلى إريثروميسين A.

الشكل الفعال بيولوجياً للسكريات التي تخدم كمادة لإنزيمات غليكوزيل ترانسفيراز هي سكريات نيوليوسيد ثنائية الفسفو (nucleoside diphospho) (NDP)، منشَطة عند C_1 بواسطة رابطة NDP (الشكل ١٢,٢٠) لنقلها إلى بعض المواد المشاركة أيفة النواة. وفي سكريات –NDP للمضاد الحيوي، وتكون النيوكليوسيدات نوعياً بيريميدين (TDP) pyrimidine TDP أو UDP المطابق. وهكذا فمسارات البناء الحيوي لسكريات ديوكسي هذه تنتج -TDP-L mycarose أو TDP-D-desosamine، ابتداءً من غلوكوز TDP الذي أُنتج بدروه من المستقلبات الأولية TTP و -1-P glucose (ثورسون وآخرون Thorson *et al.*, 2001).

الخطوط العريضة لمسارات سكريات ديوكسي هذه هي لتحويل غلوكوز -TDP (TDP-glucose) إلى كيتوغلوكوز-٤-TDP (TDP-4-ketoglucose)، ومن ثم التخلص الماء نحو 4-keto-glucose-6-ene وإنقاص الرابط المزدوج المقترن لتكوين ٤-كيتو-٦-ديوكسي غلوكوز كوسيط شائع ومبكر (الشكل ١٢,٢٠). ومن هذا ٤-كيتو-٦-ديوكسي سكر NDP هناك إنزيمات محددة التي تزامر كل من C_3 و C_5، أحدهم يمكن أن يتخلص من OH- عند C_2 لإحداث نقص الأكسدة (deoxygenation) الصافي واختزالياً يؤمَن (يصبح مركب أميني) (aminate) عند C_3 أو C_4. ويتيح التزامر الفوقي (epimerization) لـ C_5 الدخول إلى مجموعة سكر- -TDP-L. وبالإمكان أن تحدث الأمثلة لـ N و C عند مواقع كاربانيونيك (carbanionic sites) المجاورة لمجموعة ٤-كيتو. وتنتج الإنقاصات الإنطباقية (chiral reductions) لمجموعات ٤-كيتون سكريات ديوكسي- TDP المنتهية مثل دونوسامين، ديسوسامين، وL- مايكاروز في الميكروليدات أو L- فانكوسامين (L-vancosamine) في الفانكوميسين. وعلى سبيل المثال، في TDP- ديسوسامين (الشكل ١٢,٢٠)، قد تم تحويل C_3-OH إلى أمين بواسطة (التخفيض الأميني لـوسيط C_3,C_4 -داي كيتو) (reductive amination of a C_3,C_4-diketo intermediate) و *N,N*-dimethylated بواسطة SAM، ولقد تم اختزال C_4 من الكحول إلى CH_2 واختزال C_6 إلى الحالة CH_3. لقد تم إنقاص الأكسدة من TDP-L-mycarose (الشكل ١٢,٢٠) عند C_2 و C_6، أمثلة- C عند C_3 وتزامرت عند C_5 قبل نقلها إلى سقالة ماكرولاكتون بواسطة EryBIV. وهكذا، توجد آلية إنزيمية واسعة مكرسة لإنتاج تبديلات ديوكسي و أمينو على هيكسوسيز الطبيعي المشتق من الأيض الأولي لعملية ارتباط بالغليكوزيل للبوليكيدات - بعد خط التجميع.

الشكل (١٢,٢٠). التحويلات لإنتاج TDP-D -desosamine وTDP-L-mycarose من TDP-4-keto-6-deoxyglucose في تجميع إريثروميسين.



الزخارف التركيبية في الحقول المحفزة والحاملة لببْتيد سينثازات غير الريوسومية.

الفصل الثالث عشر

خطوط التجميع الإنزيمية لمضادّات البِبْتيد الحيوية غير الريبوسومية
ENZYMATIC ASSEMBLY LINES FOR NONRIBOSOMAL PEPTIDE ANTIBIOTICS

كما لوحظ في الفصول السابقة (الفصول الثالث والسادس والعاشر)، تنتج نسبة كبيرة من منتجات البِبْتيديك (peptidic) الطبيعية التي لها نشاط المضاد الحيوي بواسطة ببتيد سينثاز غير الريبوسومية (peptide synthases) (NRPSs) (الشكل ١٣،١) (للمراجعة، انظر كونز وماراهيل Konz and Marahiel, 1999، ماراهيل وآخرون Marahiel *et al.*,1997، وفون دورين وآخرون von Dohren *et al.*, 1997). وتشمل هذه ACV (إل-أمينوأديبيل-إل-سيستينيل-دي- فالين) ACV (L-aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine)، طليعة البِبْتيد الثلاثي لعائلة مضادّات بيتا لكتام الحيوية، تيروسيدين وجراميسيدين S (tyrocidine and gramicidin S) والمضاد الحيوي الموضعي باستراسين. وبالإضافة إلى أن الغليكوببتيدات من مجموعة فانكوميسين تنشأ على خطوط تجميع NRPS، ومن ثم تعدل بشكل كبير، كما لوحظ لاحقاً في هذا الفصل. وبالمثل، مضادّات البِبْتيد الدهنية (ليبوبِبْتيد) الحيوية مثل راموبلانين ودابتوميسين (ramoplanin and daptomycin) تصنع بهذه الطريقة. وأخيراً، بريستناميسينات-ذو-الشقين من معقد سينيرسيد هما هجين للبِبْتيد غير الريبوسومي وخطوط-تجميع بوليكيتيد سينثاز.

وحدات الاستهلال، الإطالة والإنهاء: الحقول الأساسية والحقول الإضافية

تمتلك حفّازات NRPS متشابهات تنظيمية مع النوع I بوليكيتيد سينثاز (PKSs) كمحفزات متعدِّدة الحقول منظمة إلى وحدات، مع وحدات متعدِّدة تم تجميعها في وحدة بروتين فرعية واحدة أو أكثر. والمثال الأقصى هو الإنزيم الفطري سيكلوسبورين سنثيتاز (cyclosporine synthetase) الذي يجمِّع دواء أنديكابِبْتيد الحلقي المثبط لمناعة سيكلوسبورين أ (cyclic undecapeptide immunosuppressant drug cyclosporine A) على عديد البِبْتيد مفرد ذي الوزن الجزيء 1.5MDa، مع ٤٣ حقول في ١١ وحدة، واحدة لكل حامض أميني التي تم اختيارها، تنشيطها، ودمجها إلى داخل السلسلة النامية. ويمتلك ACV synthetase ثلاث وحدات في عديد البِبْتيد ذا 450 kDa (الشكل ١٣،٢)، في حين أن سقالة البِبْتيد السباعي للفانكوميسين أو كلوروإرموميسين (chloroermomycin) (الشكل ١٣،٢) تجمع بواسطة ثلاث وحدات فرعية مع ثلاثة، ثلاثة، ووحدة واحدة، بالترتيب.

Penicillins

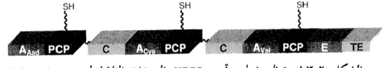
Vancomycin

Bacitracin

Pristinamycin IIa

Pristinamycin Ia

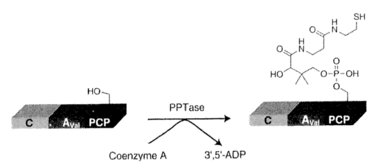
الشكل (١٣,١). أمثلة على المضادّات الحيوية التي تُصنع على خطوط – تجميع ببتيد سنثيتاز غير الريبوسومية.



الشكل (١٣,٢). تنظيم خط – تجميع NRPS: الوحدات الثلاث لـ ACV synthetase.

وكما في خط – تجميع النوع PKS I، خطوط – تجميع NRPS لها وحدة بدء (استهلال) السلسلة عند النهاية N، ومن ثم ترتب وحدات الإطالة ترادفياً قبل وحدة الإنهاء عند نهاية C لخط – تجميع البروتين. الحقول الأساسية لوحدات الإطالة متشابهة مع تلك خطوط – تجميع في النوع PKS I (انظر الفصل الثاني عشر) ولكن تسمى في

وحدات NRPS تكثيف (C)، أدنلة (A)، وحقول البروتين حامل بِبْتيديل ((peptidyl carrier protein (PCP)). وكل حقل 8-to-10-kDa PCP مماثل تركيبياً ووظيفياً لحقول ACP (الفصل الثاني عشر)، وتمر بنفس التعديلات بعد- الانتساخ للسلسلة الجانبية سيرين على HS- pant holo PCP apo PCP to HS-pantetheinylated بواسطة الإنزيمات الشريكة المكرَّسة فوسفوبانتيثينيل ترانسفيراز (phosphopantetheinyltransferase (PPTase) (لامبالوت وآخرون Lambalot *et al.*, 1996). ويخدم حقل HS-pant-PCP في كل وحدة كموضع إرساء للربط التساهمي للحامض الأميني الموحود الذي سوف يندمج في داخل السلسلة النامية (الشكل ١٣،٣).

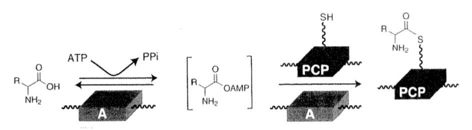


الشكل (١٣،٣). الحقول الأساسية لوحدة إطالة NRPS: C-A-PCP وتحويل Apo PCP إلى حقول PCP الكاملة بواسطة عملية فوسفوبانتيثينيليشن بعد – الإنتساخية.

كل حقل A في الوحدة C-A-PCP ينتقي وينشط الحامض الأميني ليُربط على HS-PCP المجاور. ويحدث انتقاء الحامض الأميني بواسطة ربط الحقل A في الموقع النشط، والرمز للتمييز قد فُكت شفرته بواسطة توليفة تحليل أشعة –إكس على phe- المنشطة لحقل A من جراماسيدين إس سنثيتاز (gramicidin S synthetase)، تحليل المعلوماتية الحيوية لأكثر من ١٥٠ حقل، نشوء الطفرات (mutagenesis) لتغيير الانتقاء (ستاكيلهوس وآخرون Stachelhaus *et al.*, 1999). يحول الحامض الأميني المرتبط إلى أمينو أسيل– AMP بمجرد انفلاق ATP (الشكل ١٣،٤) وإطلاق PP_i. ويعد تفاعل النصف الأول لحقول A هذه مماثل لتلك لأمينو أسيل– tRNA سينثيتازات التي تنشط الأحماض الأمينية لتكوين رابطة البِبْتيد المعتمدة على – الريبوسوم، يقترح تحليل أشعة – إكس التطُّور المتقارب لحقول A وأمينو أسيل – رنا سينثيتازات. وبينما ينقل أمينو أسيل tRNA سينثيتيسز مجموعة أمينو أسيل النشطة ديناميكياً وحركياً للربط مع tRNAs المشابهة، تنقل حقول A مجموعة أمينو أسيل إلى حقل *cis* HS-pant-PCP لتوليد aminoacyl-*S*-PCP في كل وحدة (الشكل ١٣،٤).

الخصوصية (النوعية) لحقول A وترتيبها واستبدالها في وحدات خط التجميع NRPS تزود الإرشادات لبناء البِبْتيد في القالب ثيو (thiotemplated). وعلى النقيض من ببتيد سنثيتاز الريبوسومي، حيث ينشط جمع أمينوأسيل–

tRNA سينثيتيسز الخلوي فقط ٢٠ من الأحماض الأمينية المولدة للبروتين، تم العثور على أكثر من ١٠٠ حامض أميني في منتجات الببْتيد الطبيعية غير الريبوسومية، مشيراً إلى التنوع الكبير في تمييز موحود الحمض الأميني، ويشمل تنشيط الحماض الأمينية -β,γ- و-δ، مثل بيتا–الآنين (β-alanine)، -γ امينوبيوتايريت (γ-aminobutyrate) و-δ أمينوأديبيت (δ-aminoadipate) (كونز وماراهيل Konz and Marahiel، ١٩٩٩) (الشكل ١٣,٥).



الشكل (١٣,٤). خطوتين من تحفيز أدلة حقل NRPS: انتقاء وتنشيط الحمض الأميني كأمينو أسيل-AMP (aminoacyl-AMP) محكم الربط، نقل مجموعة أمينو أسيل لتوليد وسيط aminoacyl-*S*-PCP المكافيء.

β-Alanine

2,6-Diamino-7-Hydroxy-Azelaic Acid

δ-(α-Amino Adipic Acid)

3,5-Dihydroxy-Phenylglycine

2–Amino-9,10-Epoxy-8-Oxodecanoic Acid

4-Hydroxy-Phenylglycine

α-Amino Butyric Acid

Ornithine

(*E*)-2-Butenyl-4-Methyl-Threonine

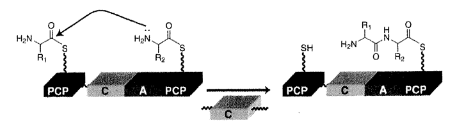
الشكل (١٣,٥). أمثلة للأحماض الأمينية غير المولدة للبروتين منتقاة لدمج السلسلة بواسطة حقول NRPS A.

والثالثة من الحقول الأساسية في وحدة إطالة NRPS، الحقول C، هي حفَازات تكثيف لتكوين رابطة– الببْتيد، التي تستعمل المنبع الفوري ببْتيديل – -*S*- PCP بين الوحدة (intermodular peptidyl-*S*-PCP) كمانح لسلسلة أسيل

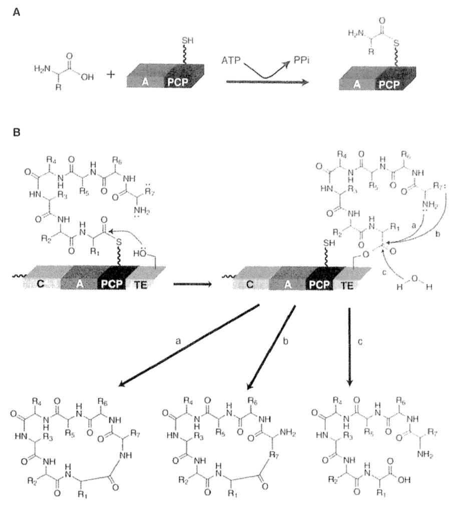
وأمينو أسيل- PCP-*S* داخل الوحدة (intramodular aminoacyl-*S*-PCP) كقابل أليف النواة (الشكل ١٣,٦) من خلال مجموعة أمينو الحرة. وتشكيل رابطة ببتيد أحادي الاتجاه وتتحرك سلسلة بِبْتيديل النامية من المنبع إلى حقل المصب HS-PCP. الحقل C مشابه وظيفياً لحقل كيتوسينثاز (ketosynthase) في خطوط تجميع النوع PKS I، ولكن، بدلاً من صنع الروابط- C-C، يصنع اتصال C-N في تكوين رابطة البِبْتيد.

تميل وحدات إطالة السلسلة لأن تفتقر لحَقل C وبدلاً من ذلك تمتلك تركيب حقل —اثنين A-PCP لتنشط وتُحمل الحمض الأميني الأول فوق حقل HS-PCP الأول (الشكل ١٣,٧ A)، كما مُثل في ACV synthetase المشروحة أدناه. وتملك وحدات إنهاء السلسلة التركيب العام C-A-PCP-TE، حيث النهاية- C لحقل ثيوإستيراز (thioesterase domain) (TE) لها نفس الدور كما في خطوط - تجميع النوع I PKS، لفصل رابطة ثيوإستر التساهمية بين سلسلة بِبْتيديل - كاملة الطول وحقل PCP أقصى المنبع. ومثل خطوط - تجميع PKS، بإمكان حقل NRPS TE كحفَازات حالة مائية أو حفَازات تحليق ضخمة (macrocyclization) (الشكل ١٣,٧ B) (تروجر وآخرون Trauger *et al*., 2000).

وبالإضافة إلى حقول C-A-PCP الأساسية في وحدات NRPS ربما تجري خطوط - تجميع خاصة خطوات كيميائية إضافية أثناء إطالة السلسلة وتوضع حقول إضافية في هذه الوحدات حيث يحدث حياكة كيميائية للسلسلة النامية. وعلى سبيل المثال، يملك انديكابِبْتيد (undecapeptide) الحلقي سيكلوسبورين A المثبط للمناعة مجموعات N-methyl فوق سبعة من روابط البِبْتيد، وتوجد سبعة حقول S- ادينوسيل ميثيونين (S-adenosylmethionine)- تستعمل — N- ميثيل ترانسفيراز (*N*-methyltransferase) المطمورة في الوحدات السبعة لخط - تجميع سيكلوسبورين سنثيتاز (فون دورين وآخرون von Dohren *et al*., 1997). وسوف نلاحظ أدناه حقول التقسيم الفوقي (epimerization) في خطوط- تجميع ACV، فانكوميسين، وتيروسيدين (tyrocidine) وحقول التحليق المتغاير (heterocyclization) في الوحدة الثانية من باستراسين سنثيتاز كحقول حياكة إضافية وُضعت في *cis* في خطوط - التجميع.



الشكل (١٣,٦). عمل حقل C في تحفيز NRPS: تكثيف رابطة البِبْتيد والإطالة عن طريق نقل سلسلة بِبْتيديل إلى مصب الحقل PCP.



الشكل (١٣،٧). (A) الحقلين – PCP لوحدات سلسلة الإطالة، (B) الأربعة حقول C-A-PCP-TE لوحدات إنهاء السلسلة وثلاث مسارات مختلفة لإنهاء السلسلة.

خطوط – التجميع لــ ACV، ببْتيدات الفانكوميسين السباعية، تيروسيدين، وباستراسين: التزامر، التحليق الضخم، والتحليق المتغاير

الإنزيم الذي يجمّع طليعة الببْتيد الثلاثي الآحلقي (الآدوري) لأنواع البنسيلّين والكيفالوسبورين في أكريمونيم كريسوجينم *(Acremonium chrysogenum)* ، الكائن المنتج للبيتالكتام، هو عديد الببْتيد–المفرد NRPS (single-polypeptide NRPS). وكما هو مبين في الشكل (١٣،٢)، يملك ACV سنثيتاز ١٠ حقول في بروتين 450kDa ليقوم بتجميع قالب ثيو (thiotemplated) من ACV. توجد ثلاثة أحماض أمينية التي يتعين انتقائها وتنشيطها كأمينو أسيل – AMPs وهكذا يوجد ثلاثة حقول A ،بـ Aad ، Acyc ، Aval، رتبت بهذا النظام في وحدات الإنزيم الثلاث. كما

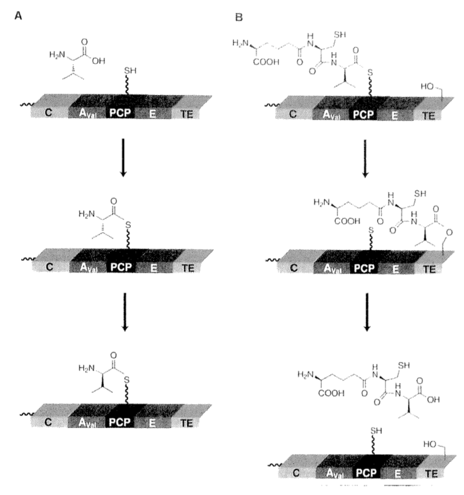
يوجد ثلاثة حقول holo HS-PCP، أنشات بواسطة فوسفوبانتيثينيليشن بعد الانتساخي من apo PCPs، للربط التساهمي كأمينوأديبيل– S-PCP_1 (aminoadeipyl-S-PCP_1)، سيستينيل– S-PCP_2 (cysteinyl-S-PCP_2) وفاليل– S-PCP_3 (valyl-S-PCP_3). وتتشكل ٢ رابطة ببتيد، الأولى بين أمينو أديبيت وسيستين والحفّازة بواسطة الحقل C في الوحدة ٢، والثانية بين Aad-Cys-S-PCP_2 كمانح و Val-S-PCP_3 كمستقبل، بواسطة الحقل C في الوحدة ٣، مولداً إنزيم–إس–بيبتديل الثلاثي (tripeptidyl-S-enzyme) المُرسَى عند PCP. وهذا مسئول عن ثمانية من ١٠ حقول.

والحقل التاسع هو حقل التزامر (E) في الوحدة ٣، حيث يستطيع تزامر L-Val-S-PCP_3 نحو D-Val-S-PCP_3. ويمر لتزامر خلال Cα- كاربانيون (Cα-carbanion) الخطي المرسَخ –بالرنين ويسمح بدخول هذه بسهولة أكثر في فاليل–ثيوإستر (valyl-thioester)، Val-S-PCP_3، ومن ثم في فالين الحر. وهو من غير الواضح إلى الآن إذا ما كانت فضالة فاليل تتزامر نحو خليط – D,L قبل أو بعد التكثيف (مثل L,L,L-tripeptidyl-S-PCP). وإذا حدث ذلك قبل، فمن ثم الحقل C في الوحدة ٣ يجب أن يكون نوعياً (خاصاً) للمستقبل Val-S-PCP_3. وإذا أثر التزامر على tripeptidyl-S-PCP_3 بعد التكثيف، بعدها الحقل TE ربما يكون خاصاً بـ D (D-specific) (الشكل ١٣,٨ A). الحقل العاشر والأقصى نهاية–C، الحقل TE، يعمل في خط–التجميع هذا كإنزيم مذوِّب (hydrolase) بسيط. وحقل TE هو عضو من عائلة ضخمة من الإنزيمات المذوِّبة –ألفا–بيتا (α-β-hydrolases) ذات الموقع النشط سيرين. وتستعمل الموقع النشط للسلسلة الجانبية Ser كأليف النواة ليهاجم ترايبِبْتيديل ثيو إستر وينقل السلسلة ليصنع الإنزيم الوسيط tripeptidyl-O-Ser-TE (الشكل ١٣,٨ B).

وهذا النوع الذي بعد ذلك يتحلل مائياً في خطوة نزع الأسيل التي تحرر خط التجميع NRPS لدورة التحفيز التالية، مطلقاً L,L,D-tripeptide-COOH. وهكذا فمنطق وترتيب الحقول العشرة في ACV سنثيتاز واضح ويبين (التغيير) التطبّع في عملية تجميع سلسلة قالب ثيو بِبْتيديل.

وتجدر الإشارة إلى خاصيتين من انتقاء الحمض الأميني في استعمال ACV سينثيتيسزلأمينو اديبيت. فهو ليس فقط حامض أميني غير مولد للبروتين وكذلك فإن حقل A في الوحدة ١ والخاصة بـ Aad، تنشط C_6-COOH، وليس C_1-COOH. في أمينوأديبيت في هيئة أسيل – AMP.

وهكذا فوسيط رابطة أميد في Aad-Cys-S-PCP_2 المتشكل بواسطة الحقل C للوحدة ٢ هو رابطة ببتيد متساوية (isopeptide bond) تُحمل إلى الأمام للبِبْتيد الثلاثي المحرر. في القسم التالي من هذا الفصل سوف ننعطف إلى الحياكة الإنزيمية بعد–خط–التجميع لتحويل acyclic ACV نحو نظام الأربع/الخمس حلقات بنسيلّينات المندمجة.



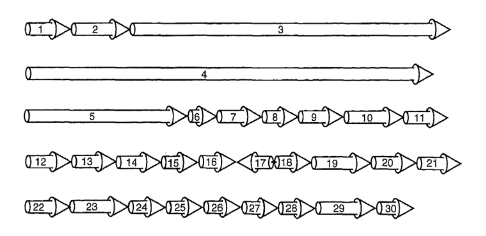
الشكل (١٣,٨). وظيفة الحقل في خط – تجميع ACV synthetase: (A) عمل الحقل E لصنع D-Val-*S*-PCP₃، (B) إنهاء السلسلة بواسطة الحقل TE من خلال وسيط إنزيم tripeptidyl-*O*-Ser-TE acyl.

التجميع الإنزيمي للبِبْتيد السباعي للفانكوميسين وكلوروإرموميسين (chloroermomycin)

للفانكوميسين وكلوروإرموميسين هيكل ببتيد سباعي ذا ربط–تبادلي مشابه. وكتلة جين البناء الحيوي لكلوروإرموميسين، ولكن ليست بعد للفانكوميسين، قد وُجِد أنها تحتوي على كتلة من بعض ٣٠ جين (فان واجيننجين وآخرون van Wageningen *et al*., 1998) (الشكل ١٣,٩). والجدير بالذكر في هذه الكتلة ثلاثة أطر قراءة مفتوحة كبيرة جداً، ORFs 4 to 6، التي ترمِّز الوحدات الفرعية الثلاث CepA, CepB، وCepC من NRPS hepapeptide synthetase. ومعاينة ترتيب الحقل المفترض من التحليل المعاوماتية الحيوي (الشكل ١٣,١٠) يظهر ٢٤ حقل موزعة فوق الثلاث وحدات الفرعية، مع الوحدات التي تحتوي على CepA ١ إلى ٣ ، الوحدات CepB ٤ إلى ٦ ، والوحدة السابعة CepC. والمنطق المستعمل لـ ACV ترايبِبْتيد سنثيتاز هو قابل للانتقال لخط –تجميع NRPS هذا. وسبعة

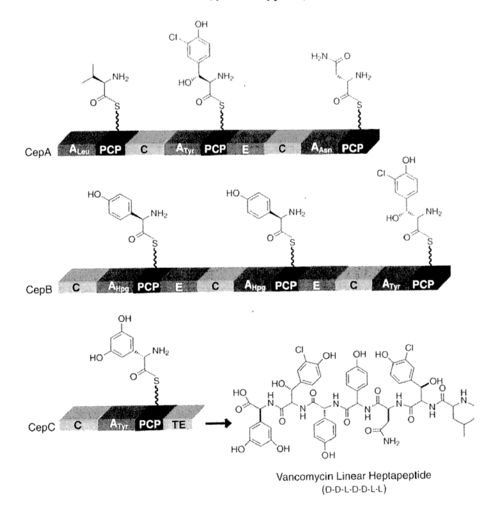
أحماض أمينية في الببْتيد السباعي تلزم حقول سبعة A وسبعة حقول PCP مقترنة بالشكل HS-pantetheinyl holo لتكون وظيفية. وتوجد ستة روابط ببتيد لتصنع و ٦ حقول. كما توجد أربعة أحماض امينية-دي (D-amino acids) في الآحلقي السباعي (D,D,L,D,D,L,L-acyclic heptamer). وتوجد حقول التزامر في الوحدات ٢، ٤ و ٥ ولكن ليس في الوحدة ١. وأخيراً، هيكل الببْتيد السباعي في المنتج الطبيعي هو الحامض الحر وحقل TE يفترض بأن يكون الإنزيم المُذوب لببْتيديل السباعي- S-PCP$_7$ (heptpeptidyl-S-PCP$_7$ hydrolase). ومصدر D-Leu عند الفضالة الولى مازال غير معروف، ولكن الحقل A يستطيع أن ينشط كل من L-Leu و D-Leu ويغرس D-Leu على HS-PCP المجاور من الوحدة ١ (تروجر ووالش Trauger and Walsh, 2000).

وإذا كان الحقل C للوحدة ٢ هو D-specific خاص للمانح Leu$_1$، بعد ذلك يمكن حل المسألة. وافتراضياً الحقل C في الوحدة ٣ هو خاص للمانح D-D-dipeptidyl ولكنه مستقبل L-Asn-S-PCP$_3$، بينما حقل C في الوحدة ٥ سوف يفترض بأنه يميز مانح الإنزيم D-D,L,D-tetrapeptidyl-S-enzyme ومستقبل D-4-OH-pheGly-S-PCP. والنوعية شيرال (chiral specificity) لحقول C لم يتم بعد التحقق من صحتها تجريبياً.



Function	ORF	Function	ORF
Nonribosomal Peptide Synthetase	3-5	HPG Synthesis	1, 17, 21, 22
Oxidative Crosslinking	7-9	DHPG Synthesis	27-30
N-Methylation	16	β-OH Tyr Synthesis	18-20
Halogenation	10	Transport	2
Glycosyl Transfer	11-13	Regulation	6
Sugar Synthesis	14, 23-26	Epimerase	15

الشكل (١٣,٩). ثلاثون جينات مجتمعة للبناء الحيوي لكلوروإرموميسين.



الشكل (١٣,١٠). ٢٤ حقل، سبعة خطوط تجميع الوحدة للعمود الفقري للبِبْتيد السباعي لكلورإرموميسين أو فانكوميسين سنثيتاز.

والخاصية الأخيرة الجديرة بالذكر في خط تجميع البِبْتيد السباعي هذا هي إستعمال إثنين من موحودات الحمض الأميني الغير مولد للبروتين، D-4-OH-pheGly عند المواضع ٤ و ٥ و $3,5\text{-}(OH)_2$-pheGly عند الموضع ٧. وجميع سلاسل أريل الجانبية – الغنية بالإلكترون تشارك في تفاعلات الربط – التصالبي لما – بعد – خط – تجميع NRPS، سيتم شرحها أدناه. يُصْنع 4-OH-pheGly وموحودات $3,5\text{-}(OH)_2$- pheGly كـ L-isomers بواسطة الإنزيمات التي ترمز كذلك في كتلة البناء الحيوي (الشكل ١٣,٩). تؤدي أربعة مسارات – إنزيم من كوريسميت (chorismate) عن طريق بارا–هيدروكسيفينيل بيروفيت (*para*-hydroxyphenylpyruvate) وبارا–هيدروكسيمانديليت (*para*-hydroxymandelate) إلى (ORFs 1,17,21,22) 4-OH-pheGly، بينما 3,5-dihydroxy isomer تشتق بدلا من ذلك ومن النوع III PKS يتبعها الثلاث إنزيمات من عائلة كروتوناز (crotonase) الضخمة (ORFs 27 to 30 في الشكل ١٣,٩)،

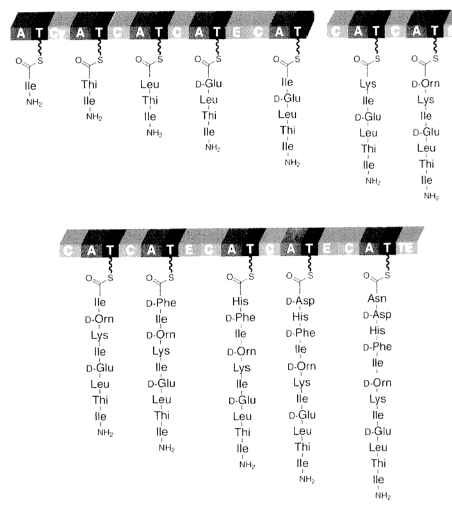
مستعملةً أسيل- CoAs في تكثيفات كلايزين التكرارية (iterative Claisen condensations) لبناء الحمض الأميني- ذي الثمانية كربون المندمج عند الفضالة ٧ (تشين وآخرون Chen *et al.*,2002). وهذه الثمانية ORFs تؤكد على تنسيق التنظيم والالتزام لإنتاج موحودات الحمض الأميني غير المولدة للبروتين في قاعدة في - الوقت المحدد وتصادق على تقلبات (تعددات) NRPS لحقول A لتدخل التغيرات في خطوط - تجميع البِبْتيد في قالب ثيو.

خطوط تجميع باستراسين وتيروسيدين: التحليقات الضخمة (macrocyclizations) بواسطة حقول TE

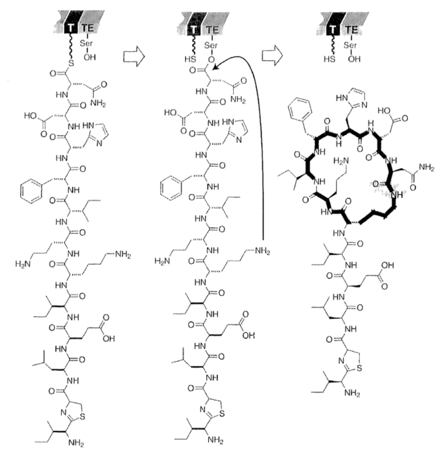
تتألف خطوط تجميع تيروسيدين سينثاز وباستراسين سينثازمن العصية بريفيس *(Bacillus brevis)* والعصية ليكينيفورميس *(Bacillus licheniformis)*، بالترتيب (الشكل ١٣،١١)، من ثلاث وحدات فرعية التي تحتوي على ١٠ و١٢ وحدة، بالترتيب، لمضادّات ديكا - ودوديكا ببتيد الحيوية (deca-and dodecapeptide antibiotics). وكلاهما بِبْتيدات حلقية متصلة بتحليق الناحية الكيميائية (regiochemistry) المختلف. وتيروسيدين حلقي من الرأس إلى الذيل، ومجموعة أمينومن D-phe$_1$ تهاجم كربونيل- Leu$_{10}$ (Leu$_{10}$ carbonyl) لتصنع الأميد الحلقي (انظر تروجر وآخرون Trauger *et al.*, 2000)، ولكن باستراسين قد تم تحليقه ليعطي تركيب أولي طويل مع سلسلة جانبية مجموعة أمينو من Lys$_7$ التي تهاجم كربونيل من فضالة النهاية Asn$_{12}$ (الشكل ١٣،١٢). التحليقات المتميزة تحفز بواسطة حقول TE عند نهاية خطوط -تجميع NRPS هذه، تعمل كإنزيمات مُحلِّقة ماكرولكتاميزنج سيكلازات (macrolactamizing cyclases) بدلاً من الإنزيمات الحالة (hydrolases). يجب ـن تُحجز (تفصل) وسائط acyl-*O*-TE حركياً من الماء وتُطوى في داخل هيئة - نشطة - الموقع بحيث إن روابط إستر Leu$_{10}$-COO-TE و Asn$_{12}$-COO-TE يمكن أسرها بين الجزيئات بواسطة أمين أليفات النواة في سلاسل بِبْتيديل. وفي حالة تيروسيدين سنثيتاز، فقد ثبت بأن حقل TE يملك جميع المعلومات الضرورية لتحريض ثني (طي) السلسلة والتحليق بما أن حقل TE المستأصل يحتفظ تلقائياً بالكفاءة المحفزة لتحليق ديكابِبْتيديل - ثيوإستر وعندما يعرض مع استبدال دي- فينيل أكتيل (D-phenylactyl) عند D-phe$_1$، سوف تُنتج الماكرولاكتون. الفرق بين التحليل بالماء (hydrolyzing) والتحليق (cyclizing) لحقول TE في النوع I PKS وفي خطوط - تجميع NRPS ليس واضحاً بعد ولكن ستكون ذات أهمية في الأساليب التوافقية نحو التحليقات الضخمة.

إضافة إلى نوع تركيب ماكرولكتام الوهق الخاص به، يملك باستراسين خاصية تركيبية إضافية جديرة بالذكر: الفضالات ١ و٢، Ile$_1$-Cys$_2$، يتم تحويلها إلى خمس-حلقات داي هيدروثيازول (five-ring dihydrothiazole)، ثيازولين (thiazoline)، أثناء خطوة إطالة السلسلة في الوحدة ٢ (الشكل ١٣،١٣). وتحليل حقل التكثيف في الوحدة ٢ لباستراسين سنثيتاز يكشف أن بديل (متغير) وعضو من العائلة الفرعية لحقل التحليق (Cy) (كياتنج ووالش Keating and Walsh, 2001). وبالإضافة إلى التصرف كحقل C نموذجي ومحفزاً لتكوين رابطة اميد، فحقول Cy هذه، توجد

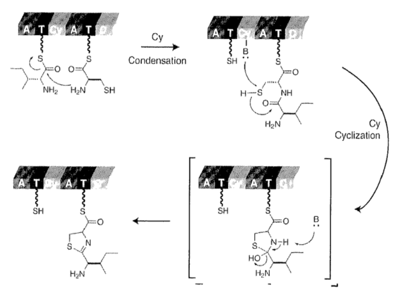
كذلك في بليوميسين سنثيتاز (bleomycin synthetase) (انظر دو وآخرون Du *et al.*, 2001)، وتحفز أولاً تحليق السلسلة الجانبية ثيوليت (thiolate side chain) من سيستين فوق رابطة الببْتيد كاربونيل التي فقط الانتهاء من تشكيلها ومن ثم التجفاف لتوليد رابطة أيمين الحلقية المزدوجة (cyclic imine double bond) ويستمد توازن التحليق إلى حلقة ثيازولين. هذا التعديل يغير الربط لسلسلة أسيل. وكذلك، فحلقة ثيازولين تعدُّ مستخلب (chelator) أيون معدني ثنائي التكافؤ جيد، التي يعتقد بأن تكون ذات صلة مع التنسيق المتواسط بـ Mg^{2+} الخاص بأنديكابرينيل فوسفيت (undecaprenyl phosphate) في عمله المضاد الحيوي (الفصل الثالث).



الشكل (١٣,١١). خط تجميع NRPS لتيروسيدين سنثيتاز.



الشكل (١٣,١٢). إطلاق سلسلة باستراسين بواسطة ماكرولكتاميزيشن البين الجزيئ بواسطة حقل TE لباستراسين سينثيتاز: لصنع رابطة ببتيد المتساوية لـــ Lys_7-Asn_{12}.



الشكل (١٣,١٣). عمل حقل التحليق لباستراسين سنثيتاز لإنشاء حلقة ثيازوليدين من Cys_1-Leu_2.

علم إنزيمات بعد – خط تجميع ACV: ACV إلى بنسيلّينات إلى كيفالوسبورينات – مقارنة مع البناء الحيوي لكاربابينيم و كلافولينيت.

يحفز التحويل الإنزيمي للببْتيد الثلاثي ACV الآحلقي إلى تركيب بيتا لكتام ثنائي الحلقة من البسيلينات بواسطة إنزيم Fe^{II} واحد غير محتوٍ على الهيم (nonheme)، أيزوبنسيلّين N سينثاز (isopenicillin N synthase) (IPNS) الذي يختزل المادة المشاركة O_2 بواسطة أربعة إلكترونات إلى جزيئين من الماء (الشكل ١٣,١٤). وبدوره فحلقة بيتا لكتام تمتد من ثيازوليدين ذي الخمس – حلقات (five-ring thiazolidine) إلى حلقة ثنائي هيدروثيازين ذات الست – حلقات (six-ring dihydrothiazine ring) لمضادّات كيفالوسبورين الحيوية، مرة أخرى بواسطة إنزيم غير المحتوي على الهيم Fe^{II} داياوكسيجينيز (Fe^{II} dioxygenase) (الشكل ١٣,١٥) التي تعمل بعد أن يُحول إيبيميراز (epimerase) أيزوبنسيلّين N (isopencillin N) إلى pencillin N بواسطة توازن مركز L- aminoadipyl C_2 مع الخليط– D-L. ويعرف إنزيم إكسبانداز كذلك بديكيتوكسي كيفالوسبورين سي سينثاز (deacetoxycephalosporin C synthase) (DAOCS)، يعمل فقط على د–أمينو اديبيل–بنسيلّين (D-aminoadipyl-pencillin)، ويتطلب جزيء من ألفا–كيتوغلوتاريت (α-ketoglutarate) كمادة مشاركة و وينزع الكربوكسيل إلى سكسينيت (succinate) و CO_2 بينما يُختزل O_2 إلى H_2O وذرة الأكسجين الثانية تدمج في داخل سكسينيت كربوكسيل.

L-α-Aminoadipate + L-Cysteine + L-Valine

ACV synthetase

L-δ-(α-Aminoadipoyl)-L-Cysteinyl-D-Valine (ACV)

O_2 → Isopenicillin N Synthase → 2 H_2O

Isopenicillin N → Penicillins

الشكل (١٣,١٤). التحليق المزدوج لـ ACV إلى هيكل بيتا لكتام البنسيلّينات بواسطة أيزوبنسيلّين إن سينثيتاز.

Isopenicillin N

2-Oxoglutarate

DAOC Synthase

Succinate

Cephalosporins

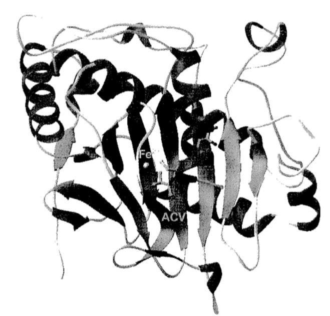
Deacetoxycephalosporin C (DAOC)

الشكل (١٣,١٥). تمديد حلقات البنسيلّينات الخمس إلى ست حلقات للكيفالوسبورينات بواسطة إكسباندآز (expandase) (deacetoxycephalosporin C synthase).

ولقد تم حل تراكيب أشعة–إكس لكل من IPNS، من الرشاشية نيديولانس *(Aspergillus nidullans)* (روتش وآخرون Roach *et al.*, 1997) (الشكل ١٣,١٦)، وdaocs من المتسلسلة كلافوجيريس (فاليجارد وآخرون Valegard *et al.*, 1998)، وكشف أن الإنزيمين هما أعضاء من العائلة الكبيرة (الشكل ١٣,١٧) دايأكسيجينازات حديد فروز (ثنائي التكافؤ) غير المحتوي على الهيم (nonheme ferrous iron dioxygenases). ويستعملوا ٢ His وواحد كاربوكسيلات (Asp/Glu) كربيطات للهيكل (انظر كيو Que, 2000) لـ Fe^{II}، كما يعمل الإنزيم الثالث في استقلاب بيتالكتا المؤكسد، كلافامينيت سينثاز (clavaminate synthase) (CAS) (زانج وآخرون Zang *et al.*, 2000)، المذكور لاحقاً.

بينما يظهر DAOCS وCAS ألفا–كيتو ديوكسيجيناز نازع كربوكسيل–الحمض (α-keto acid –decarboxylating dioxygenase) النموذجي قياس العناصر (stoichiometry) من هيكل الموقع – النشط لحديد الفروز الشائع هذا، يتشعب (يحيد) IPNS بحيث لا يتطلب المادة المشاركة ألفا–كيتو الحامضية وبواسطة عدد الإلكترونات التي تمت إزالتها من المادة. يؤكسد IPNS، ACV بواسطة أربعة إلكترونات كلما أنشأ نظام الأربع/الخمس حلقات المندمج لهيكل البنسيلّين، بعمل كل الإلكترونات الأربعة في شكل قمع (funneling) نحو O_2 عندما يختزل إلى جزيئين من H_2O. وعلى النقيض، يعمل DAOCS وCAS اثنين أكسدة إلكترونات للمادة المرتبطة في كل دورة تحفيزية. ومن الواضح بأن نفس المنصة (البرنامج) المعمارية لحديد الفروز يمكن توجيهها نحو الكيمياء المتنوعة ولكن الانتقائية المستندة – على الأكسجين بواسطة ربط المادة القابلة للأكسدة. ويعتقد بأن جميع الإنزيمات الثلاث تولد أنواع فريل ferryl $Fe^{IV}=O$ باعتبارها مفتاح أكسدة لدورة – أكسدة الإلكترونين (two-electron redox cycle). ويولد DAOCS

وCAS مؤكسد فريل من عملية نزع الكربوكسيل المؤكسدة من ألفا-كيتوغلوتاريت المرتبط، في حين يعتقد بان IPNS يولد المؤكسد $Fe^{IV}=O$ بواسطة أكسدة – اثنين إلكترونات من ACV بمجرد أن يتم تحليقه، مع تكوين رابط C-N، لوسيط بيتا لكتام الأحادي الحلقة المنسق – بالحديد (iron-coordinated monocyclic β- lactam intermediate) (الشكل ١٣,١٧) (روتش وآخرون Roach *et al*., 1997).



الشكل (١٣,١٦). تركيب أشعة – إكس لـ IPNS مع الحديد الموقع – النشط والمادة المرتبطة ACV.

الشكل (١٣,١٧). الآليات المقترحة لتكوين الحلقة الأولى (بيتا لكتام) بواسطة IPNS.

النصف الثاني من تفاعل IPNS هو أكسدة – اثنين إلكترون جي/تحليق (two-electron oxidation G/cyclization) للاكتام الأحادي المنسق – بثيول نحو حلقة ثيازوليدين مع تكوين رابطة S_{Cys} إلى $C\beta_{Val}$ بواسطة خطوتين واحد- إلكترون (الشكل ١٣،١٨) واختزال اثنين – إلكترون الملازم لـ $Fe^{IV}=O$ عودة إلى Fe^{II}-OH. وبشكل مماثل، فتمديد الحلقة بواسطة الإنزيم إكسباندايز DAOCS expandase يستخدم $Fe^{IV}=O$ لكسر رابطة S-$C\beta$ في الثيازوليدين ومن ثم يعيد إغلاق الكبريت الجذري (sulfur radical) فوق CH_2 الجذري المشتق من تجريد ذرة الهيدروجين من أحد مجموعات بروشيرال-بيتا ميثيل (prochiral β-methyl groups). وذلك يمد (يوسّع) الحلقة من خمسة إلى ستة ويولد أولفين الداخلي الحلقة (endocyclic olefin) (الشكل ١٣،١٩) بمجرد إعادة توليد القاعدة الأساسية Fe^{II}. ويحتمل بأن فعاليّة أنواع حديد Fe^{II} oxo عدلت بواسطة نهج مادة القيود الهندسية في كل موقع نشط وربما كذلك بواسطة التغييرات المحكَمة في مجال تنسيق الحديد عند نقاط مختلفة في هذه الدورات الحفّازة المعقدة.

الشكل (١٣،١٨). تكوين الحلقة الثانية من البنسيلّينات بواسطة IPNS مع إختزال وسيط فيريل (ferryl intermediate).

الشكل (١٣،١٩). تمديد الحلقة بواسطة DAOCS مع إختزال وسيط فيريل.

الكاربابينيمات وهيكل أوكسوبينام (oxopenam) من الكلافولينيت يُحضرا بواسطة إستراتيجية إنزيمية مختلفة. ولا يشتقا من منتجات الببْتيد غير الريبوسومية. وفي الواقع، ينتج -2-em-3-carboxylate 5R-carba البسيط بواسطة

إروينيا كاروتوفورا و سيريشيا مارسيسينز *(Serratia marcescens)* المجمّعة من acetyl-CoA والحمض الميني غلوتامات بواسطة كتلة ثلاثة- إنزيمات للبناء الحيوي، CarA-C (الشكل ١٣،٢٠) (لي وآخرون Li *et al.*, 2000). والحلقة الخامسة تُصطنع أولاً، بواسطة CarB إلى ٢-كربوكسيميثيل برولين (2-carboxymethyl proline). وينشط الكاربوكسيلات بواسطة CarA، البيتالاكتام سينثيتاز (*β*-lactam synthetase) في التفاعل الذي يصنع وسيط acyl-AMP على السلسلة الجانبية CH_2-COOH ومن ثم يستعمل الأمين للإزاحة البين الجزيئية لـ AMP بمجرد تكوين لاكتام ذا- الأربع أعضاء (باكمان وآخرون Bachmann *et al.*, 1998). ووسيط كاربابينيم هذا غير مشبع بطريقة مؤكسدة بواسطة CarC والرسم البياني ٤/٥ رأس الجسر المُتزامر ليولد المنتج الطبيعي. ولـ CarA و CarB مناظرات في مسار البناء الحيوي لكلافولينيت (الشكل ١٣،٢١) حيث إن الحمض الأميني أرجنين (arginine) والمستقلب الأولي دي- جليسرالديهيد-٣ فوسفيت (D-glyceraldhyde-3phosphate) الطلائع. والخطوة الأولى هي ثيامين-بيروفوسفيت المعتمد على التولي الإنزيمي (thiamine-pyrophosphate dependent enzymatic generation) لكاربوكسيثيل أرجنين (carboxythylarginine)، التحويل غير العادي للغاية، الذي يشمل التحكم الداخلي للأكسدة والتخلص (من P_i) وإضافة مجموعة أرجنين ألفا- NH_2 (arginine α-NH_2 group). الخطوة الثانية هي فلق ATP — بيتا لكتام سنثاز (ATP-cleaving *β*-lactam synthase) آخر لتوليد الاكتام الأحادي عن طريق الهندسة المعمارية المختلفة من أسباراجين سنثتاز (asparagines synthetase) (خليليي وآخرون Khaleeli *et al.*, 2001). ويقترح تركيب أشعة - إكس للكتام سنثيتاز مع كاربوكسيثيل أرجنين المرتبط ومشابه ATP هندسة مطابقة مسبقة التنظيم موافقة لتكوين بيتالاكتام البين الجزيئ (ميلر وآخرون Miller *et al.*, 2001).

ومن ثم يعمل CAS Fe^{II} داي أكسيجينيز (CAS Fe^{II} dioxygenase) في ثلاث خطوات منفصلة (الشكل ١٣،٢١)، أولاً كهيدروكسيلاز ليركب OH بالقرب من الكاربوكسيلات وينتج بروكلافوأمينيت (proclavuaminate). ثم يعمل CAS كسيكليز مؤكسد مضيفاً أكسجين الكحول إلى C_4 من بيتا لكتام، مولدا ٤/٥ وصل الحلقة في دايهيدروكلاف أمينيت (dihydroclavaminate) (زانج وآخرون Zhang *et al.*, 2000). والتفاعل الثالث المتتالي لـ CAS هو نزع التشبع المؤكسد، إدخال الرابطة المزدوجة الخارجية الحلقية التي تنتج إينول إيثر (enol ether) في كلاف أمينيت. وتظهر الثلاث تفاعلات لـ CAS معالجة متقنة للتفاعلات الكيميائية لمنصتي (برنامجي) two-His/ Asp platform لـ Fe^{II} في الموقع النشط.

^-O_2C … ^+H_3N … CO_2^- + CH_3COO^- —CarB→ ^-O_2C … HN … CO_2^- —CarA→ … CO_2^- —CarC (O_2, Enz-Fe, α-Ketoglutarate)→ … CO_2^- + … CO_2^-

الشكل (١٣،٢٠). عمل الترادف لـــ CarA-C لتوليد نواة الكاربابينيم.

الشكل (١٣,٢١). ثلاث تحولات مؤكسدة بواسطة CAS أثناء بناء كلاف أمينيت.

تفاعل إنزيمات بعد – خط – التجميع: الأكسجة وارتباط بالغليكوزيل لأجليكونات (aglycones) للفانكوميسين وتيكوبلانين وأسَلة تيكوبلانين

تحوّل ثلاثة إلى أربعة أنواع من تفاعلات النضوج الإنزيمية ببتيد أجليكونات السباعي (هيبتابِبْتيد) الآحلقي (acyclic heptapeptide aglycones) من الفانكوميسين وتيكوبلانين إلى مضادّات الغليكوببتيد وغليكوبِبْتيد الدهنية الحيوية النشطة، بالترتيب (انظر هوبارد ووالش, Hubbard and Walsh, 2002). أولاً: مجموعة أمينو الحرة من $D\text{-}Leu_1$ للفانكوميسين هيبتابِبْتيد يُؤمثل (*N*-methylated)، باستعمال S-أدينوسيل مثيونين (*S*-adenosylmethionine) كمادة مشاركة، تنفذ بواسطة إن – ميثيل ترانسفيراز الذي هو ORF 17 في مجموعة البناء الحيوي كلوروإرموميسين (الشكل ١٣,٩).

ثانياً: الربط – التصالبي المُصلّب الذي يحدث في سلسلة أريل الجانبية. ففي هيكل كلوروإرموميسين/ فانكوميسين، يوصل الربط–التصالبي سلاسل أريل الجانبية للفضالة ٢ و٤، ٤ و٦، و٥ و٧ (الشكل ١٣,٢٢)، بينما في هيكل تيكوبلانين، ترتبط فضالات ١–٣و٢–٤و٤–٦و٥–٧ تصالبياً. ويحول الربط–التصالبي الببْتيد الآحلقي المرن إلى شكل بناء هندسي على شكل –كوب شديد التقييد الذي يعطي السطح المتمم ليتفاعل مع الهدف ن-أسيل- د-الآنين-د-الآنين *N*-acyl-D-Ala-D-Ala في نهاية ببتيدوغليكان لجدار الخلية البكتيري.

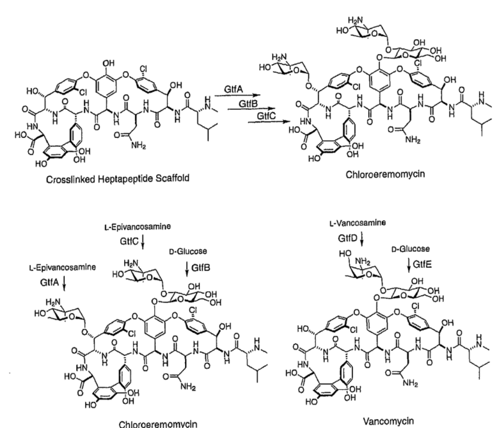
Acyclic Heptapeptide → Crosslinked Scaffold

الشكل (١٣,٢٢). الروابط – التصالبية المصلّبة التي توصل سلاسل أريل في عائلة الفانكوميسين.

والربط–التبادلي ٤–٢ و ٦–٤ هما روابط أريل إيثر (aryl ether bonds)، في حين أن الربط–التبادلي ٧–٥ هو رابط C-C مباشر، ولكن بالإمكان صياغة كليهما كازدواج جذري لبيتا–OH كلورو–تيروسينات electron-rich β- (OH-chloro-tyrosines) الغني بالإلكترونات (الفضالات ٢ و ٦)، ٤–OH –فينيل جليسين (4-OH-phenyglycine) (الفضالات ٤ و ٥)، و ٣,٥ –داي هيدروكسي فينيل جليسين (3,5-dihydroxy phenylglycine) عند الفضالة ٧ (الشكل ١٣,٢٣). في مجموعة كلوروإرموميسين، يوجد ثلاثة أنصاف بروتينات ORFs 7 to 9، وتوجد مشابهتان في مجموعة باهليميسين (bahlimycin) المتورطة في عمليات الطرد الجيني (بيسكوف وآخرون Bischoff *et al.*, 2001) كحفّازات الربط–التصالبي. وهذه السيتوكرومات P450 المفترضة، تستطيع توليد جذور فينوليكس في السلاسل الجانبية لمواد البِبْتيد السباعي لتبدأ الروابط–التبادلية. وإذا كانت أنصاف البروتين (hemiproteins) الفردية حفّازات لانتقائية موضع (regioselective) الربط–التصالبي لم يحدد بعد.

والمجموعة الثالثة من إنزيمات النضوج هي غليكوزيلترانسفيرازات (glycosyltransferases)، ثلاثة (GtfA,GtfB, and GtfC) للثلاثة سكريات المراد إضافتها إلى كلوروإرموميسين واثنين (GtfD و GtfE) في مجموعة فانكوميسين للسكريات الاثنين هناك (لوسي وآخرون Losey *et al.*, 2001، سولينبيرج وآخرون Solenberg *et al.*, 1997). يضاف السكر الأول لفينوليك–OH (phenolic-OH) من فضالة $PheGly_4$، ويدفن في الربط–التصالبي ٦–٤–٢ (الشكل ١٣,٢٤) ويستعمل TDP-glucose كمادة مانحة مع GtfB كحفّاز.

الشكل (١٣,٢٣). آليات تحليق فينوكسي الجذري للربط – التصالبي المتواسط – بانصاف البروتين المقترحة في عائلة فانكوميسين.



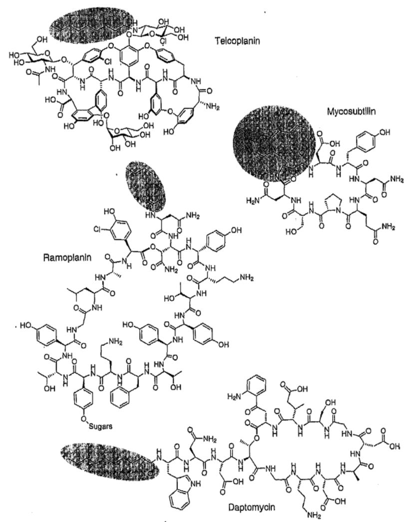
الشكل (١٣,٢٤). ثلاثة غليكوزيل ترانسفيرازات نوعية الموضع لحياكة أجليكون في نضوج كلوروإرموميسين.

وهذا البِبْتيد السباعي المرتبط تصالبياً من غلوكوزيل (glucosyl-cross-linked heptapeptide) هو الآن المادة الثانية لـ Gtf(GtfC for chloroermomycin)hglh]m hglahv;m). المادة المشاركة لمسار كلوروإرموميسين هي L-TDP بيتا – إيبيفانكوسامين (TDP-L-β-epivancosamine)، بينما في مسار فانكوميسين هي شطر TDP-L-β-vancosamine مع اختلاف فقط في تكوين C_4-OH في السكر. وشطر إيبيفانكوميسين/فانكوميسين ينقل إلى C_2-OH في مجموعة غليكوزيل، مكوناً رابطة ٢,١ داي سكريد (1,2-disacchride linkage). وهذا يكمل البناء الحيوي للفانكوميسين، بينما يستعمل Gtf(GtfA) الثالث في مسار كلوروإرموميسين جزيء آخر من TDP-L-β-epivancosamine لعملية (epivancosaminylate) β-OH للفضالة السادسة في هيكل ببتيد وينتج مضاد كلوروإرموميسين الحيوي.

والنوع الرابع من التعديلات في هذه العائلة من المضادّات الحيوية تحدث فقط في الصنف الفرعي للتيكوبلانين ويتضمن أسَلة (acylation) مجموعة أمينو لسكر واحد، جلوكوسامين. وسوف يتم شرحه في سياق عمليات أسلة أخرى لمضادّات البِبْتيد غيرالريبوسومية أدناه. وفي تيكوبلانين تختلف الهوية ووضع السكريات، مع إن–أسيل أمينوجلوكوسيزات (*N*-acylaminoglucoses) على أكسجين فينوليك من $PhGly_4$ و β-OH-Tyr_6 ومجموعة مانوسيل (mannosyl group) على الفضالة ٧.

مضادّات البِبْتيد الدهنية وغليكوبِبْتيد الدهنية الحيوية

عدد من الببتيدات غير الريبوسومية هي بِبْتيدات دهنية بخاصية أسلة-إن (*N*-acylation) مع سلاسل أسيل الدهنية على مجموعة أمينو لفضالة الحمض الأميني الأول. ويشمل ذلك دابتوميسين (daptomycin)، راموبلانين (ramoplanin)، ميكوسوبتيلين (mycosubtilin)، وتيكوبلانين (الشكل ١٣،٢٥). وبإمكان سلسلة أسيل أن تكون مستقيمة مشبعة (ميكوسوبتيلين)، مشعبة طرفياً (سورفاكتين surfactin)، وغير مشبعة (راموبلانين)، يعكس تكملة الأحماض الدهنية المصنوعة من هذه الكائنات المنتجة. ولقد تم نشر البناء الكامل لراموبلانين، مما يفتح الباب أمام دراسات النشاط-التركيبي (جيانج وآخرون Jiang *et al.*, 2002). ودابتوميسين في المرحلة ٣ للتجارب السريرية للعداوى المزجبة-لغرام (انظر برونسون وباريت Brosnson and Barrett, 2001 a). وتظهر مستبدلات بيتا أمينو- أسيل الدهني (*β*-amino fatty acyl)، كما في ميكوسوبتيلين وتصنع في الموقع (in situ)، كما هو مبين لاحقاً.



الشكل (١٣،٢٥). الببتيدات الدهنية المصنوعة بواسطة خطوط - تجميع ببتيد سنثيتاز غير الريبوسومية.

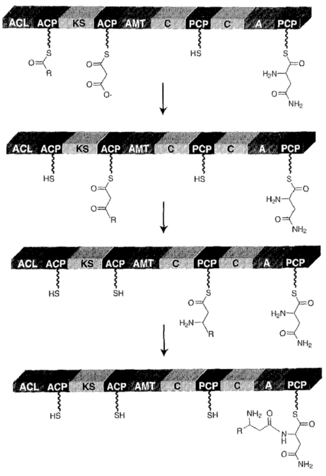
في معظم مجموعات البِبْتيد الدهني NRPS التي تم تسلسلها إلى اليوم، أسيل ترانسفيراز المسئول عن أسلة –غير منتهية – إن للحمض الأميني لا تتعين مع مجموعة (كتلة) البناء الحيوي ويعرف القليل عن نوعيتها (خصوصيتها). وفي حالة ميكوسوبتيلين، الحقول الخمس الأولى للوحدة الفرعية MycA (الشكل ١٣،٢٦) تكون مكرَسة لبناء مجموعة C_{16}-β-NH_2-acyl group (دوتمان وآخرون Duitman *et al.*, 1999). ويعتقد بأن حقل ليغاز أسيل أ م ب acyl-AMP ligase ينشط بالميتيت (palmitate) ويغرسه عل الحقل ٢، الواقع مباشرة عند مصب ACP_1. وحقل ٣ هو كيتوسيتيز، حقل ٤ هو ACP_2 الذي يُحمَل افتراضياً مع مجموعة مالونيل. التكثيف بواسطة كيتوسيثيتيز (ketosynthetase) سينقل سلسلة أسيل C_{16} ويصنع سلسلة β-keto-acyl-C_{18} على ACP_2. والحقل الخامس له تشابه مع أمينوترانسفيرازات (aminotransferases) ومن المحتمل أنه ينقل ينقل عبر الأمين (transaminate) β-keto-acyl-*S*-ACP إلى بيتا –أمينو على حساب مادة الحمض الأميني المشاركة التي يجري أكسدتها إلى حمض كيتو.

يفترض بأن الحقل التالي، C_1، ينقل سلسلة أسيل إلى PCP_1 ومن ثم يكثفه C_2 فوق مجموعة أمينو من Asn_1 المربوطة عند PCP_2 لتعطي N-capped Asn-PCP_2.

ومن هنا تتواصل إطالة السلسلة بواسطة عمليات خط – تجميع – NRPS الطبيعية. وأسلة– N لنهاية N لهذه البتيدات غير الريبوسومية لها تشابه مع فورميلة–ن N-formylation لنهاية N مثيونين في بناء البروتين الريبوسومي في البكتيريا، مما يفرض الجاهية بما أن فورميلمثيونيل (formylmethionyl) يستطيع أن يعمل فقط كمانح، وليس مستقبل، في خطوة تكوين رابط–البِبْتيد. ومن المحتمل كذلك بأن البِبْتيد غير الرايبوسومي N-acylations توفر مراسي للغشاء لتحدد موقع المنتجات عند واجهات الغشاء. الهدف لراموبلانين هو الدهن II في البناء الحيوي لببتيدوغليكان، الذي هو في مثل هذا الموقع. السلسلة الدهنية في دابتوميسين يحتمل بأن تكون حاسمة (مهمة) لخواصها–المقلقة للغشاء. الاستعمال الثالث لسلاسل أسيل الدهنية β-OH و fatty acyl chains β-NH_2، مثال، سورفاكتين وفي مضادّات البِبْتيد الدهنية الحيوية أيتورين (iturin)، هي أنها توفر أليفات النواة البين الجزيئية في التحليق المتواسط بـ TE كخطوات إنهاء في خطوط–تجميع NRPS. حلقة ماكرولاكتون من بيتا هيدروكسي أسيل البِبْتيد السباعي سورفاكتين هو من β-O fatty acyl إلى الكربونيل من Leu_7.

تعدُّ أسلة تيكوبلانين التي تكمل تكوين مضادّات غليكوببتيد الحيوية مميزة عن الأمثلة أعلاه. سلسلة أسيل ليست على نهاية N من هيكل البِبْتيد. وبدلاً عن ذلك فتوجد على مجموعة أمينو لسكر أمينو. ولم تحدد هوية أسيل ترانسفيرازات بعد، على الرغم من أنه من المحتمل أن تكون acyl- CoAS أو acyl-S-ACPs هي المواد المشاركة. وتزجد مشابهات في البناء الحيوي للدهن A في البكتيريا السالبة –لغرام، حيث الفضالة GlcNAc ينزع منها الأسيتيل (deacetylated) إنزيمياً ومن ثم يعاد أسلتها (reacylated) بواسطة الإنزيم البنائي الحيوي مستعملاً السلسلة الطويلة acyl-*S*-ACP كمادة مشاركة.

المعالجة لسلاسل أسيل في كلا الشكلين من مضادّات البِبْتيد الدهنية الحيوية ربما تكون أحد الطرق لتفاوت التركيب وتحسين الخواص ضد الكائنات المقاومة.



الشكل (١٣,٢٦). آلية الأسلة-N عند النهاية N لخط – تجميع ميكوسوبتيلين سنثيتاز.

خطوط – تجميع مهجن NRPS-PKS: بريستيناميسينات (pristinamycins)، ريفاميسين (rifamycin)، وبليوميسين (bleomycin)

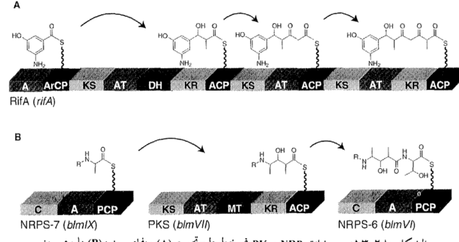
تعدُّ بعض المضادّات الحيوية هجين للبِبْتيدات غير الريبوسومية وبوليكيتيدات (انظر دو وآخرون Du *et al.*, 2001)، وتشمل بريستيناميسين IIB، المضاد الحيوي المضاد للورم بليوميسين وريفاميسين (الشكل ١٣,٢٧).

المركبان الأوليان يظهران بوضوح جزء تراكيب من كل نوع من خط التجميع. ولبريستيناميسين IIB ثلاثة أحماض أمينية، Gly,Ser وPro ومدفونة فيما بين امتدادات بوليكيتيد. وبليوميسين له امتداد بوليكيتيد قصير، مرمز بواسطة الوحدة الفرعية BLM VIII، المدفونة في تركيب البِبْتيد غير الريبوسومي. وريفاميسن، وإن كان يبدو أنه

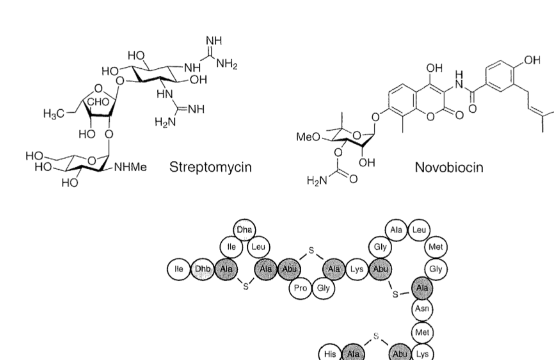
مضاد بوليكيتيد حيوي بواسطة المسح الضوئي لتركيبه، له وحدة بادئة ٣-امينو-٥-هيدروكسي بنزويت (3-amino-5-hydroxybenzoate) (الشكل ١٣،٢٨) التي تنشط بواسطة بادئ-السلسلة ديدومين (didomain) الذي يعدُّ أدنلة (adenylation) وبروتين حامل أريل، مذكراً ببداية البِبْتيد غير الرايبوسومي سيدروفور سينثيتازات (siderophore synthetases) (أدميرال وآخرون Admiraal *et al.*, 2001).

وفي هذه الحالات حيث جينات البناء الحيوي قد تم استنساخها وتسلسلها، فخطوط-التجميع تمثل بالفعل فسيفساء (mosaic) لوحدات PKS وNRPD. وترتيب ووضع الوحدات يتنبأ بالبوليكيتيد أو موحودات البِبْتيد غير الريبوسومية التي حصل وثم إختيارها ودمجها في سلاسل أسيل الهجينة بمجرد نموها ونقلها كسلسلة من وسائط إطالة acyl-*S*-(ACP/PCP) التساهمية.

الشكل (١٣،٢٧). هجين NRPS-PK: بليوميسين، بريستينامايسين IIA، وريفامبين، العضو من عائلة ريفاميسين.



الشكل (١٣،٢٨). وحدات NRP و PK في خطوط-تجميع (A) ريفاميسين و(B) بليوميسين.



المضادّات الحيوية المصنَعة بتنوع

الفصل الرابع عشر

البناء الحيوي لأصناف المضادّات الحيوية الأخرى
BIOSYNTHESIS OF OTHER CLASSES OF ANTIBIOTIC

يناقش هذا الفصل المنطق الإنزيمي لتكوين الأصناف الأخرى من المنتجات الطبيعية التي استخدمت في الطب البشري كمضادّات حيوية. اختيار الموضوعات المحددة المكملة لبوليكيتيد ومضادّات الببْتيد غير الريبوسومية في الفصلين الثاني عشر والثالث عشر. وأصناف المنتجات الطبيعية الأخرى ذات نشاط المضاد الحيوي لم تشرح بالتفصيل، ويرجع ذلك جزئياً لعدم المعرفة بالمنطق الإنزيمي للبناء الحيوي أو بسبب محدودية الاستخدام في علاج البشر. ولسياق أوسع من أصناف المنتجات لطبيعية تتجاوز تلك التي وُصفت هنا، بالإمكان الرجوع إلى سلسلة التسع *مجلدات كيمياء المنتجات الطبيعية الشاملة* *(Comprehensive Natural Products Chemistry)* (بارتون وآخرون Barton *et al.*,1999).

فوسفوميسين (Fosfomycin)

السمة الأبرز حول المضاد الحيوي فوسفوميسين (الشكل ١٤،١)، الذي يثبط MurA، الإنزيم الأول في البناء الحيوي لببتيدوغليكان (الفصل الثالث)، هي وجود رابط C-C مباشر في رابطة حمض فوسفونيك (phosphonic acid). وفوسفوميسين هو واحد من مجموعة صغيرة من المنتجات الطبيعية التي تحتوي على -C-P المعروفة، ويظهر أن جميعها تثبت رابط C-C بواسطة نفس المسار الإنزيمي. وأمينو إيثيل فوسفونيت (aminoethylphosphonate) هو عنصر من الأغشية الدهنية تتراهيمينا *(Tetrahymena)*، بينما يعدُّ فوسفينوثريسيل–الآنين–الآنين (phosphinothricy-Ala-Ala) (بيالافوسBialaphos) مبيدات أعشاب C-P ثلاثي الببْتيديل (C-P tripeptidyl herbicide).

Bialaphos   Aminoethylphosphonate   Fosfomycin

الشكل (١٤،١). ممثل المنتجات المحتوية على – C-P الطبيعية: بيلافوس، أمينو إيثيل فوسفونيت، و فوسفوميسين.

ينتج فوسفوميسين بواسطة المسار الإنزيمي ذا الخطوات – الأربع الفعال، المرمّز بالجين *fom-1-4* في المنتج المتسلسلة ويدمورينسيس *(Streptomyces wedmorensis)*، من المستقلب الأولي فوسفواينولبيروفيت (phosphoenolpyruvate (PEP)) (سيتو Seto, 1999) (الشكل ١٤,٢). الإنزيم الأول، فوسفونوبيروفيت ميوتيز (phosphonopyruvate mutase) (Fom1)، يثبت رابط C-P بواسطة الأسر البين الجزيئي من قبل أنيون C_3 إينوليت (anion C_3 enolate) كرابطة C_2-OPO_3 في كسور PEP في الموقع النشط ميوتيز (mutase). ومن ثم فوظيفة حمض ألفا-كيتو دي كاربوكسيلاتيد (ينزع الكربوكسيل) إلى ألديهايد (aldehyde) (Fom2) وتؤمثل بواسطة الإنزيم الذي يستخدم – ميثيل كوبالامين (methylcobalamin) (Fom3). والخطوة الأخيرة، الحفّازة بواسطة Fom4، وهو التحليق غير المسبوق لمجموعة C_2-OH فوق C_1- CH_2 لتكوين حلقة إيبوكسيد وإنتاج فوسوفوميسين.

OH
O=P—OH
O
CO_2H
PEP Phosphomutase
HO P OH CO_2H
PnPy Decarboxylase
HO P OH H
PnAA Methyltransferase
HO P OH OH CH_3
HPP Dehydrogenase
HO P OH H H CH_3
Fosfomycin

الشكل (١٤,٢). مسار البناء الحيوي من PEP إلى فوسفوميسين.

وبالإضافة إلى الجينات التركيبية الأربعة، عدة جينات مجاورة مشتركة في الحماية – الذاتية لمنتج المضاد الحيوي. وثلاثة جينات *orfI,orfJ* و *orfK*، يبدو أنها عناصر لبروتين مضخة التصدير لفوسفوميسين. كذلك، يضفي OrfA وOrfB مقاومة بواسطة فسفرة المضاد الحيوي الداخل الخلية، ويفترض قبل تصديره، إلى فوسفوميسين أحادي الفوسفيت (fosphomycin monophosphate) وفوسفوميسين ثنائي الفوسفيت (fosphomycin dipphosphate)، بالترتيب (الشكل ١٤,٣). ويملك فوسفوميسين ثنائي الفوسفيت سلسلة جانبية مشابهة لنيوكليوسيد ثلاثي الفوسفيت (nucleoside triphosphates). وكل من فوسفوميسين أحادي الفوسفيت وفوسفوميسين ثنائي الوسفيت غير فعالة ولكن بالإمكان تحللها إنزيمياً مرة أخرى لفوسفوميسين النشط بواسطة فوسفتازات (phosphatases) في الوسط الخارجي. وهذه الحماية – الذاتية العكوسة تحفظ رأس حرب إيبوكسيد الكيميائي (epoxide chemical warhead)، على النقيض من فتحة إيبوكسيد المتواسطة – بغلوتاثيون (glutathione-mediated epoxide) في البكتيريا المقاومة التي لا تعدُّ منتجة

لفوسفوميسين (الفصل العشر). وتعدُّ فسفرة الشكل البين الخلوي للمضاد الحيوي لنوع نشاطه قبل التصدير إستراتيجية متبعة كذلك من قبل منتجي ستربتوميسين، كما لوحظ في القسم التالي.

FomA → FomB → Activation

Fosfomycin diphosphate
Inactive form

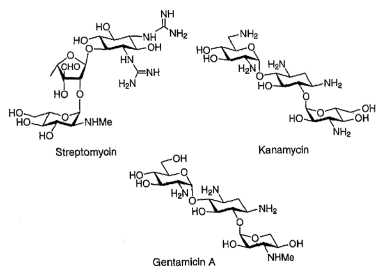
الشكل (١٤,٣). فسفرة الترادف التسلسلي لشطر فوسفونيت في فوسفوميسين كآلية حماية – ذاتية في الشعية ويدمورينسيات.

المسارات البنائية الحيوية لمضادّات أمينوغليكوسيد الحيوية

مضادّات أمينوغليكوسيد، أو أمينوسيكليتول الحيوية، تمثل منتجات أيض الكربوهيدرات الثانوية وهي منتشرة بين الشعيات (actinomycetes). بُدئ بعزل ستربتوميسين في ١٩٤٤م، تم اكتشاف مختلف أعضاء من العائلة خلال السنوات الخمس والعشرين التالية (بيبرسبيرج Piepersberg, 1997)، ويشمل توبراميسين (tobramycin) في ١٩٧٠م. ويستمر ورود تقارير عن أمينوسيكليتولات (aminocyclitols) الجديدة إلى التسعينيات. واثنين من الفئات الرئيسة لمضادّات الكربوهيدرات الحيوية مُمَثّلة بصنف ستربتوميسين (الشكل ١٤,٤) وبالمضادّات الحيوية المحتوية على ٢-ديوكسي ستربتامين (2-deoxystreptamine) التي تشمل نيوميسينات (neomycins)، كاناميسينات (kanamycins)، وجنتاميسينات (gentamicins) (الشكل ١٤,٤). ولستربتوميسين ٣ ثلاثة مكونات سكر: سيلو-إنسيتول- (-scyllo inositol-derived aminocyclitol (streptidine)) المشتق من أمينوسيكليتول (ستربتيدين) الموصل بعنصر ٦-ديوكسي هيكسوز (6-deoxyhexose) (ستربتوز streptose) الموصل مع إن-ميثيل-إل-جلوكوسامين (*N*-methyl-L-glucosamine). في المضادّات الحيوية من صنف ٢-ديوكسي ستربتامين مثال كاناميسين وجنتاميسين A، أمينوسيكليتول هو الحلقة المركزية. التعديلات الجزئية التصنيعية (semisynthetic modification) لهذه المنتجات الطبيعية قد تمت ممارستها على نطاق واسع.

فعلى سبيل المثال، إضافة السلسلة الجانبية α-OH-γ- أمينوبيتيريل (α-OH-γ-aminobutyryl) إلى 1-NH من كاناميسين ينتج الدواء السريري المعاصر أميكاسين (amikacin). وتحويل غليكوسيد – إلى – سيكليتول (-glycoside to-cyclitol)، مركزياً لمنطق مسار البناء الحيوي للمضاد الحيوي هذا، يوجد في الأيض الأولي لتوليد إينوسيتول-فوسفيت (inositol-phosphate) من غلوكوز-٦-فوسفيت (glucose-6-phosphate) (glucose-6-P) في الطريق إلى البناء الحيوي لدهن الغشاء فوسفوإينوسيتيد (phosphoinositide) (والش Walsh, 1979).

هناك بعض ٣٠ جينات مجتمعة سوياً ومنظمة في وقت واحد والتي تُشغَّل عندما تصنع المتسلسلة جريسيس ستربتوميسين (انظر بيبرسبيرج Piepersberg, 1997). وهذه مشاركة في ترميز إنزيمات أيض السكر الثانوي الذي يصنع موحودات السكر الثلاثة، ستربتيدين-6-P (streptidine-6-P)، TDP — داي هيدروستربتوز (TDP-dihydrostreptose)، و nucleoside diphospho-*N*-Me-L-glucosamine، وربطهم موضعياً و- تجسمياً نوعياً (regio-and-sterospecifically). ويأتي streptidine-6-P من المستقلب الأولي D-glucose-6-P بواسطة تفاعل الدول البين الجزيئي (intramolecular aldol) الإنزيمي لصنع cyclitol-inositol-3-P، في التفاعل المعروف جيداً (انظر والش Walsh, 1979).



الشكل (١٤،٤). صنفان تركيبيان رئيسان من مضادّات أمينوغليكوسيد (أمينوسيكليتول) الحيوية: ستربتوميسين ومثالين من كاناميسين وجنتاميسين A التي تحتوي على -٢-ديوكسي ستربتامين (2'-deoxystreptamine).

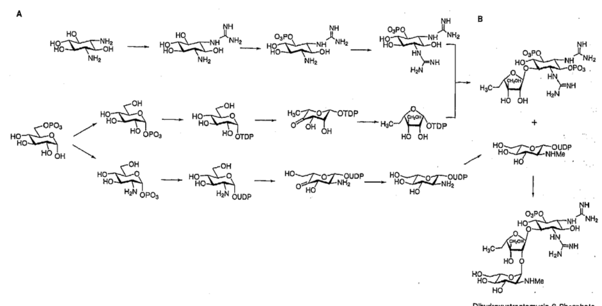
ومن ثم سلاسل من التوليد الإنزيمي لمجموعات كيتو، عمليات نقل الأمين الاختزالية (reductive transaminations)، وتحويلات جوانيدينو (guanidine transfers) تنتج بيسجوانيدينو-سيكليتول- P (bisguanidino-cyclitol-P)، ستربتيدين- P-6 (streptidine-6-P) (الشكل ١٤،٥A). وينتج TDP — داي هيدروستربتوز (TDP-dihydrostreptose) من الوسيط المشترك في البناء الحيوي لديوكسي هكسوس (deoxyhexose)، TDP -4- كيتو -٦ - ديوكسي غلوكوز (TDP-4-keto-6-deoxyglucose) (انظر الفصل الثاني عشر) بواسطة التقسيم الفوقي عند C_5 لتوليد رامنوس (TDP-4-keto-L-rhamnose)، يتبعه التحويل إلى تركيب فيورانوس (furanose) ذا الخمس-حلقات في TDP -ثنائي هيدروستربتوز، حيث ثنائي هيدرو يشير إلى حالة أكسدة الكحول لوحدة -كربون C_2OH واحدة عند C_3 (الشكل ١٤،٥، الوسط). NDP-L-glucosamine منوّق بالمثل من NDP-D-glucose عن طريق ٤-كيتو، ٥- التقسيم الفوقي، يتبعه أمْيَنَة (amination)

وN -- أمثلة عند C_3 (الشكل ١٤،٥ ، الأسفل). ويهاجم 4-OH من streptidine-6-P من C_1 TDP-dihydrostretose في التكثيف الأول لغليكوزيل ترانسفيراز، وبعد ذلك يزيح OH-′ 2 من هذا السكريد الثنائي الـ NDP من NDP-N-methyl-L-glucosamine لينتج داي هيدروستربتوميسين- P-6 (dihyrostreptomycin-6-P). وهذه نهاية المرحلة السيتوبلازمية للبناء الحيوي لستربتوميسين في المتسلسلة جريسيس وينتج عن ذلك طلائع نشطة. وهذه تُصدَّر تحديداً عن طريق مضخة معتمدة على- ATP وتُؤكسد من المرحلة ثنائي هيدروC_2OH إلى CHO في streptomycin-6-P أثناء المرور عبر الغشاء بواسطة الإنزيم المؤكسد أوكسيديز. والآن يملك streptomycin-6-P في الفضاء الخارج الخلية مجموعة $6\text{-}OPO_3$ التي أُزيلت بالتحلل المائي بواسطة إنزيم فوسفتاز وكذلك رُمِّزت في الكتلة وصُدِّرت (الشكل ١٤،٦). وهكذا فالستربتوميسين الحر هو المضاد الحيوي النشط.

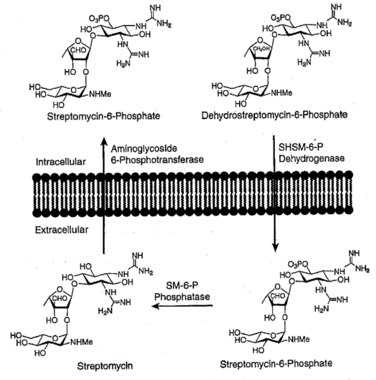
يشمل البناء الحيوي بعض ٢٧ خطوة إنزيمية. وتزود الكائنات المنتجة مقازمة – ذاتية بواسطة تراكم الطلائع غير النشطة فقط في داخل الخلية، كل من ثنائي هيدرو والمفسفرة، وتُنفذ خطوتين كيميائيتين أثناء وبعد الإفراز. وهذا مماثل للارتباط بالغليكوزيل لأولياندوميسين بينما في الخلية المنتجة لتُبقي ذلك الماكروليد غير نشط إلى أن يتم إفرازه وينزع منه السكر (deglycosylated) نوعياً (الفصل السابع). وبالإضافة إلى آليات الحماية – الذاتية هذه، بإمكان منتجي ستربتوميسين إعادة فسفرة (rephosphorylate) أي ستربتوميسين يعود مرة ثانية، عند C_6 مع فوسفوترانسفيريز (phosphotransferase). وبالمثل يفرز منتجي كاناميسين ٦′-أسيتيل ترانسفيراز (6′ acetyltransferase). وكلا الإستراتيجيتين تنذر بالآليات المكتسبة في المُمْرضات السريرية التي تصبح مقاومة لمضادّات أمينوغليكوسيد الحيوية (الفصل العاشر). أخيراً، في منتجي جنتاميسين، تزود طبقة إضافية من الحماية–الذاتية بواسطة أمثلة –N الإنزيمية للموقع عالي – الانجذاب في 16S Rrna (بيبرسبيرج Piepersberg, 1997) لخفض الانجذاب للأمينوغليكوسيدات عند الريبوسومات.

تُنظم مشغلات (operons) البناء الحيوي لستربتوميسين (الشكل ١٤،٧) بواسطة جزيئات استشعار–النصاب، كما شُرح في الفصل الحادي عشر. ففي المتسلسلة جيريسس هذا هو العنصر A بيوتانيوليد (butaneolide A factor) (الشكل ١١،٦)، التسلسل الهرمي للتنظيم العالمي والمسار المحدد، خلال مستقبل العنصر A وبعد ذلك إلى قامع strR، ينطبق على ٢٣ جينات في المُشغِلات الثمانية للشكل (١٤،٧).

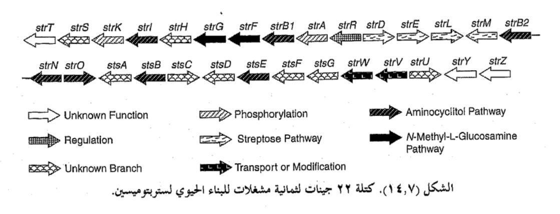
منطق صنف B أمينوغليكوسيدات مشابه من حيث التعديلات الإنزيمية لسكريات –NDP لنزع الأكسجين (deoxygenation) والأمنة الاختزالية ولتوليد أمينوسيكليتول واقّتران غليكوزيل ترانسفيراز. آفاق البناء الحيوي الاندماجية لصنع أمينوسيكليتولات جديدة، مثال، مع مزيد من الحلقات وتوصيلات جديدة، ربما تكون جيدة، لإقامة نظم لجولات جديدة من اللأكلاّت والأسلاّت (alkylations and acylations) الشبه–اصطناعية، على الرغم من أنه يبقى أن نرى إن كانت ستنتج أنشطة جديدة. وفك رموز مواقع الربط لصنف A و B أمينوسيكليتولات على 16S rRNA (الفصل الرابع) قد يساعد في تصميم مضادّات أمينوسيكليتول أفضل.



الشكل (١٤,٥). مسار البناء الحيوي إلى dihydrostreptomycin-6-P. (A) الخط العلوي: الفرع streptidine-6-P: الخط الأوسط: الفرع TDP-dihydrostreptose، الفرع NDP-*N*-methyl-L-glucosamine، (B) عمل غليكوزيل ترانسفيراز لينتج dihydrostreptomycin-6-P.



الشكل (١٤,٦). تصدير وتنشيط dihydrostreptomycin-6-P: تحويل dihydro CH_2OH إلى CHO في ستربتوميسين ونزع الفوسفور الإنزيمي الخارج الخلية.



الشكل (١٤,٧). كتلة ٢٢ جينات لثمانية مشغلات للبناء الحيوي لستربتوميسين.

البناء الحيوي للمضادّات الحيوية المشتقة من — كوريسميت (chorismate): الأمينوكيومارينات و كلورامفينيكول

مثبطات الـ دنا غيرازكلوروبيوسين (chlorobiocin)، نوفوبيوسين (novobiocin)، والمثنوي كوميرميسين (coumermycin) جميعها تشترك في أمينوكيومارين المركز (اللب) و سكر نوفيوس (noviose sugar) التي تعد مهمة للربط مع الوحدة الفرعية GyrB من دنا غيراز (الفصل الخامس) وتعرقل تكرار الـ دنا. وحلقة أمينوكيومارين الثنائية الحلقية، شيدت من تيروسين، والتي بدورها مشتقة من كوريسميت، الوسيط المهم في البناء الحيوي للحمض الأميني العطري (الشكل ١٤,٨ A).

ولقد تم تسلسل كتلة جين البناء الحيوي لكل من نوفوبيوسين وكتلة كومرميسين من المتسلسلات وسمحت بالتنبؤ بالمسار الذي فيه كل من النصفين من نوفوبيوسين يُشتق من تيروسين (الشكل ١٤,٨ B). ينشأ الجانب على اليد–اليمنى من (prenylation) للتيروسين وبعد ذلك نزع الكربوكسيل المؤكسد (oxidative decarboxylation). وينشأ الجانب على اليد–اليسرى من تيروسين -β-OH (β-OH-tyrpsine)، والذي بعد ذلك يؤكسد إلى بيتا–كيتو ويحلّق إلى كومارين. ميثلات - C ومن ثم ارتباط بالغليكوزيل (إضافة السكر) والتكثيف بواسطة برينيل بنزويت (prenyl benzoate) على اليد اليمنى، ينشئ رابطة البِبْتيد في حامض نوفوبيوسيك (novobiocic acid). يتم الربط بالغليكوزيل (glycosylated) أجليكون بواسطة TDP-noviose ليكمل مسار نوفوبيوسين (الشكل ١٤,٨ جـ). يحتوي كلوروبيوسين (chlorobiocin) وكومرميسين على مستبدلات بيرول (pyrrole) في مكان مجموعة O —كاربامويل (O-carbamoyl group) فوق سكر نوفيوس وتلك تنشأ من برولين (proline). وكل من بيتا–إدخال عنصر الهيدروجين لتريوسين وأكسدة بيتا لبرولين إلى بيرول يحدث على بركة الحمض الأميني المحتجزة، ينشط ويقيد على حقلين أمينو أسيل– بِبْتيديل لحامل بروتين سنثيتاز (aminoacyl-peptidyl carrier protein synthetase) مع تشابه مع وحدة التحميل لبيبي سنثيتاز غيرالريبوسومي (الفصل الثالث عشر) (الشكل ١٤,٩). إدخال عنصر بيتا – الهيدروجين لـ Tyr-*S*-PCP (NovH) يجري بواسطة الشريك هيميبروتين هيدروكسيلاز (NovI) (تشين ووالش Chen and Walsh, 2001)، بعد ذلك يؤكسد إلى -β-keto

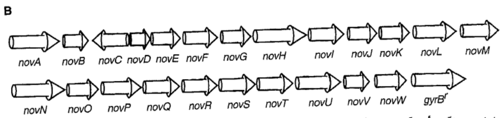
Tyr-*S*-PCP بواسطة NovJ و NovK. وهذا ربما ينشئ ليتم تحليقه إلى كومارين وليطلق من NovH. الزوج من أطر القراءة المفتوحة المقارن (١٩ و٢٠) في كتلة كلورو‌إرموميسين (الشكل ١٣،١٠) يصنع β-OH-Tyr للمواقع ٢ و٦ في هيكل الببْتيد السباعي من مضادّات غليكوببتيد الحيوية (هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002). ويؤكسد Pro-*S*-PCP بواسطة فلافوبروتين النازع التشبع (flvoprotein desaturase)، أقرب إلى تفاعل fatty acyl-*S*-PCP desaturase (ثوماس وآخرون Thomas *et al.*, 2002). ويستعمل هذا المنطق كذلم بواسطة المتسلسلة كوليكولر لتصنع أنديسيلبروديجيوسين (undecylprodigiosin) (ثوماس وآخرون Thomas *et al.*, 2002). وهذه الإستراتيجية ربما تحصل أيضاً مع البناء الحيوي لكلورامفينيكول، كما هو مبين لاحقاً.

A

Novobiocin

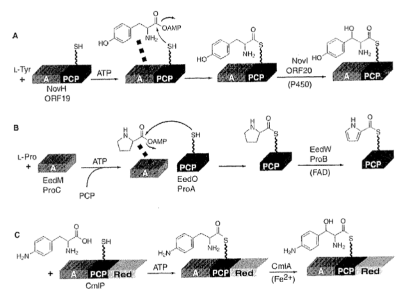
Clorobiocin

Coumermycin A1



الشكل (١٤،٨). مضادّات أمينوكومارين الحيوية والمنطق البنائي الحيوي: (A) تراكيب كلوروبيوسين، نوفوبيوسين، وكومرميسين A1، (B) جينات مسار نوفوبيوسين.

تابع الشكل (١٤،٨). (C) خلاصة الخطوات الرئيسة في تجميع نوفوبيوسين.



الشكل (١٤،٩). أكسدة بيتا لـ aminoacyl-*S*-PCP كبركة حجز للبناء الحيوي للمضاد الحيوي (A) ضافة الهيدروكسيل لنوفوبيوسين وفانكوميسين، (B) أكسدة برولين كومرميسين و انديسيل بروديجيوسين، (C) بارا–امينو فينيل الآنين لكلورامفينيكول.

تم عزل مضاد كلورامفينيكول من المتسلسلة فينزويلي *(Streptomyces venzuelae)* في ١٩٤٨م (انظر مالك Malik, 1972، فيننج ستوتارد Vining and Stuttard, 1995) واستخدم على نطاق واسع لبعض العقود كعامل مضاد بكتيري واسع – المدى، نشط ضد كل من العداوى البكتيرية السالبة لغرام والموجبة – لغرام بواسطة عرقلة بناء البروتين

البكتيري كمضاد لمستقلب الحمض الأميني. ويحدث الربط في مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية لريبوسوم 50S (الفصل الرابع). ويمكن أن يحدث تأثيرات جانبية خطيرة في الدم، وتشمل الأنيميا الآتنسجية القاتلة (fatal aplastic anemias)، التي تحد من استعماله الحالي. الكلورامفينيكول (الشكل ١٤،١٠ A) هو جزيء بسيط ذو هيكل نيتروفينيل سير-إينول (nitrophenylser-inol) الذي فيه يتم تأسيل مجموعة أمينو مع مجموعة داي كلورو أسيتيل (dichloroacetyl group). ويأتي العمود الفقري بوضوح عبر مسار كوريسميت، عن طريق أمْيَنَة، لإنتاج 4-amino-4-deoxychorismate، التي على إعادة ترتيب مسار 3-3-sigmatropic (الموجه لسيجما) والتعطير النازع للهيدروجين (dehydrogenative aromatization) يعطي بارا-امينوفينيل الآنين (*para*-aminophenylalanine) (الشكل ١٤،١٠ B). وتحويل β-CH_2 إلى CHOH لأمينوفينيل سيرين (aminophenylserine) ربما يحدث أيضاً بينما يثبت الحمض الأميني على A-PCP reductase للوحدة الفرعية للثلاثة حقول (الشكل ١٤،١٠ C). وaminophenylseryl-*S*-PCP عندئذ ينفلق اختزالياً بواسطة الحقل الثالث في البروتين ليطلق أمينوفينيل سيرينول (aminophenylserinol). وهذا الطريق من خطوتين من المضاد الحيوي. واحد هو داي كلورأسيتيليشن (dichloracetylation)، المفترض بأن يحدث من -dichloroacetyl-CoA (فيننج وستوتارد Vining and Stuttard, 1995)، والآخر هو أكسدة- N (N-oxidation) من مستبدل بارا-أمينو إلى بارا- نيترو (*para*-amino to *para*-nitro) (الشكل ١٤،١٠ D). يستخدم بعض المنطق والآلية لانتقاء ببتيد سنثيتاز غير الريبوسومي، تنشيط، وتعديل موحودات الحمض الأميني في هذه المضادّات الحيوية المستندة على الحمض الأميني.

A
Chloramphenicol

B
Chorismic Acid — FabAB — ClmD — ClmC (CO_2) — *p*-Amino-Phe

C
p-Amino-Phe — ATP / CmlP / CmlA — A PCP Red — Acyl-S-CmlP — CmlI — A PCP Red — Red — CmlP

D
Cl-C(O)-S-CoA — CmlH — CoASH

الشكل (١٤،١٠). الخطة الإستراتيجية لبناء الكلورامفينيكول: (A) تركيب كلورامفينيكول، (B) كوريسميت إلى بارا - أمينوفينيل الآنين، (C) بيتا-ضافة االهيدروكسيل وإختزال كربوكسي، (D) داي كلوروأسيتيليشن و أكسدة - N.

الخصائص الوراثية للانتيبيوتيك (lantibiotic) والبناء الحيوي لميكروسين B17 (microcin B17)

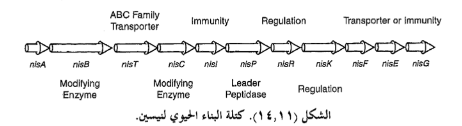
لاحظنا آليات عمل الصنف A (مثال، نيسين nicin) والصنف B (مثال، ميراسيدينmeracidin) من مضادّات البِبْتيد الجرثومية - المحتوية على لانثيونين (lanthionine)، اللاّنتيبيوتيكس، في الفصل السادس. تتجمع الجينات لإنتاج الآنتيبيوتك الريبوسومي المتولد (الشكل ١٤,١١) ويشمل الجين التركيبي الذي يرمز البِبْتيد الطليعة، جينات نزع الهيديريد هيدرتاز (dehydratase) التي تحول فضالات Ser and Thr إلى دي هيدروالآنين وديهيدروبيوتيرين (dehydroalanine and dehydrobutyrine)، الجين القائد ببتيداز (peptidase)، والجينات لمضخات التصدير لإفراز مضادّات البِبْتيد الناضجة. وعلى سبيل المثال، نيسين، مضاد ببتيد جرثومي من لاكتوكوكس لاكتيس *(Lactococcus lactis)* الواسع الاستعمال كحافظ للأغذية، يصنع من كتلة ١١-جين، *nisABTCIPRKFEG* التي تمتد 14kbp على عنصر قابل للنقل وهو نموذج لكتل جين البناء الحيوي للانتيبيوتك (انظر هانسين Hansen, 1997، للمراجعة). ويرمَز جين *nisA* شكل الطليعة لمضاد ببتيد الحيوي: وفي حالة نيسين، فله ٥٧ فضالات. وفي أثناء النضوج الإنزيمي، يحدث نوعان من التعديلات. الأول، يعدل ١٣ فضالة. ثمانية فضالات من سلاسل بيتا-هيدروكسي الجانبية من Ser، وThr، تجفف (dehydrated)، ربما بواسطة إنزيم NisB، لتنتج فضالات دي هيدريالآنين (dehydrialanine) و دي هيدرو بيوتايرين (dehydrobutyrine) (الشكل ١٤,١٢ A). خمسة من سلاسل حمض أوليفينيك (olefinic acid) الجانبية تؤسر بواسطة سلاسل خمس سلاسل سيستسن ثيوليت (cystein thiolate) الجانبية لتنتج خمس روابط ثيوإيثر (thioether linkages)، فضالات الآنثيونين وبيتا-ميثيل لانثيونين (lanthionine and β-methyl lanthionine) (الشكل ١٤,١٢ B)، التي تربط - تبادلياً نيسين الناضج وتنشئ البناء الثلاثي - الأبعاد المقيد، وثيق الصلة بالنشاط البيولوجي. وهذه تبدو الوظيفة الحفّازة لبروتين NisC.

عند هذا الالتحام يحدث النوع الثاني من التعديلات، الانفلاق الحال للبروتين لفضالات نهاية -N (N-terminal 23)، لينتج لانتيبيوتيك نيسين ذا فضالة-٣٤ الناضج (الشكل ١٤,١٢ C) . وفضالات نهاية - إن ٢٣ تعمل كطليعة ببتيد (propeptide) ضرورية للتجفاف وتفاعلات ثيوإيثر المحفزة بواسطة إنزيمات NisB وNisC وربما تساند الطية (الثنية) التي تسمح بمثل هذا التمييز. ويحدث التشذيب الحال للبروتين (proteolytic trimming) نوعياً بواسطة بروتييز NisP protease المرمز في الكتلة. ومن بين الجينات السبعة الأخرى في الكتلة، واحد، NisI، الذي يرمز وظيفة مناعية في حين أربعة (NisT,NisE,NisF, and NisG) مرتبطة في وظائف النقل أو الضخ. وNisT هو مضخة-حالة لـATP (-ATP hydrolyzing pump) للنوع الذي تم شرحه في الفصل التاسع ويعتقد بأن تكون مضخة التدفق الرئيسة (الأولية) لنيسين الناضج ولانتيبوتيكس الأخرى في كتل Lan ذات العلاقة. ويعتقد بأن تكون بروتينات NisE, NisF وNisG

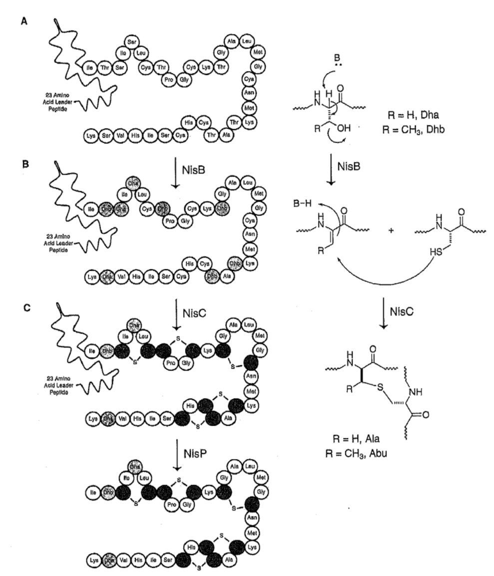
مضخة أمان – فشل (fail-safe pump) إضافية ، لإزالة أي لانتيبيوتيك الذي يجعل طريقها للرجوع فوق الخلية المنتجة وبذلك يشكل مناعة أو وظيفة مقاومة-ذاتية. وأخيراً، ترمز جينات *nisR* و*nisK* المنظم –ذا الشقين (R) وبروتينات كيناز الحسية (sensor kinase) (K) التي تتحكم في انتساخ جينات لانتيبيوتي بواسطة منطق مسار الشقين (two-component pathway logic) الذي شرح عدة مرات في هذا الكتاب. ويشير تحليل تنظيم اللاانتيبيوتيك ذا العلاقة سبتيلين (subtilin) إلى التحكم المزدوج بتنشيط جين البناء الحيوي، بواسطة كيناز الاستشعاري / منظم الاستجابة ذو – المركبين (two-component sensor kinase / response regulator) وأيضاً بواسطة إزالة الكبح (derepression) من عنصر سيجما (sigma factor) البديل لبوليميراز دنا الذي يتحكم بانتساخ جينات منظم الاستشعار / الاستجابة (ستين وآخرون Stein *et al.*, 2002).

وبوجود حوالي اثنين درزينة من كتل لانتيبيوتيك المعروفة حالياً، الببتيدات القائدة ونوعين من تعديلات السلاسل، تجفاف سلاسل β-OH الجانبية ومن ثم الأسر لصنع الروابط-التبادلية ثيوإيثر، فالاحتمالات لهندسة البِبْتيد الهجين عالية. وليس من الواضح كم من فضالات دي هيدروالآنين (dehydroalanine) ودي هيدروبيوتيرين (dehydrobutyrine) متبقية (ثلاثة في نيسين)، بواسطة تأثيراتهم المصلِّبة على روابط البِبْتيد، يضع التشكيلات الموضعية التي تساهم في نشاط المضاد الحيوي. ولصنف B من لانتيبيوتيكات، والتي لا تعدُّ أصلاً مكونات لمسام الغشاء ولكن لديها أهداف معينة مثل الدهن II في البناء الحيوي لببتيدوغليكان، الطرق الهندسية والتوافقية للمكتبات ربما يكوّن النشاط الأمثل. وتقترح دراسات التركيب/الوظيفة الحديثة بأن النوع A وB من لانتيبيوتيك لهما انتقائية مختلفة في تفاعل الدهن I والدهن II ويقترح بأن هذه لا تعمل كبِبْتيدات من كلا الجانبين (أمفيفيليك) (amphiphilic) كتيونية غيزنوعية (بروتز وساهل Brotz and Sahl, 2000).

يوجد المتغير الثاني لنضوج مضاد البِبْتيد الريبوسومي الحيوي مع المنطق المشابه لنضوجات لانتيبيوتك في مُشغِّل مضاد الإشريكية القولونية ميكروسين B17 (microcin B17) (الشكل ١٤،١٣)، مثبط دنا غيراز (الفصل الخامس عشر) (انظر سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999 ، للمراجعة). ومثل لانتيبيوتكس ، ينتج ميكروسين B17 من طليعة بروتين صغيرريبوسومي مرمَز، البروتين McbA فضالة-٦٩ (69-residue McbA protein)، والإنزيمي المعدل على سلاسل سيرين وسيستين الجانبية ، في هذه الحالة أربعة لكل واحد، بواسطة البروتينات McbB,McbC و McbD.



الشكل (١٤،١١). كتلة البناء الحيوي لنيسين.



الشكل (١٤,١٢). التعديل الإنزيمي للشكل prepro للانتيبيوتك نيسين: (A) تجفاف السلاسل الجانبية Ser وThr بواسطة NisB، (B) تكوين ثيوإيثر بواسطة مهاجمة سلاسل Cys الجانبية المحفزة بواسطة NisC، (C) الإنفلاق الحال للبروتين من التسلسل القائد لفضالة–٢٣ للنهاية –N بواسطة NisP.

Structural   Posttranslational Modification   Export   Immunity

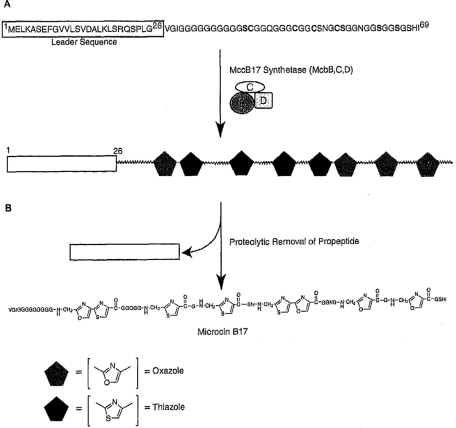
mcbA mcbB mcbC mcbD mcbE mcbF mcbG

الشكل (١٤,١٣). الجين لإنتاج ميكروسين B17 (microcin B17) والنضوج الإنزيمي للمضاد الحيوي النشط.

النتيجة الكيميائية ليست روابط – تبادلية ثيوإستر ولكن بدلاً عن ذلك التحليق المتغاير (heterocyclization) لـ Ser إلى اوكسازولز (oxazoles) و Cys إلى حلقات ثيازول (thiazole rings) (الشكل ١٤,١٤ A).

وهذه خمس الحلقات – الأعضاء، التي تنشأ من مبحث إنزيمات التجفاف التدويري (cyclodehydration (enzymology على شطور الببْتيد الثنائي Gly-Ser, Gly-Cys ، أو Ser-Cys,Cys-Ser في McbA ، يصلّب هيكل الببْتيد ويحمي ميكروسين B17 من الذوبان (التحلل) البروتيني (proteolysis). وبالتحديد، الترادف bis المتغاير الحلقي (tandem bis heterocycles) ، المتولد من Ser-Cys المجاور وفضالات Cys-Ser ، ربما تكون المحددات الرئيسة للتفاعل مع دنا–دنا–غيراز DNA-DNA-gyrase لتفلق دنا المزدوج – الخيط (هيدل وآخرون Heddle *et al.*, 2001).

التناظر الإضافي لنضوج لانتيبيوتك هو الانفلاق الحال للبروتين للفضالات ٢٦ الأولى للميكروسين بعد أن يتم إدخال الحلقات المتغايرة الإنزيمية، فإزالة الببْتيد الطليعة (propeptide) (الشكل ١٤،١٤ B). ومرة ثانية يعدُّ الببْتيد الطليعة أساسي لحدوث أي تصنيع بواسطة McbB, McbC وMcbD. ومضاد ميكروسين B17 الحيوي الناضج، مع فضالات ١٤ من٤٣ والمعدلة إلى ثمانية حلقات متغايرة، يفرز بعد ذلك بواسطة ماكنة مضخة التصديرMcbE وMcbF، في تناظر (تشابه) واضح لماكنة تصدير بروتين NisEFG. والجين السابع في مشغّل Mcb، *mcbG*، يرمَز الوظيفة المناعية التي لم تحدد بعد التي تحمي الإشريكية القولونية المنتجة من أن تحرم من DNA غيراز الخاص بها.



الشكل (١٤،١٤). النضوج الإنزيمي لميكروسين prepro B17، (A) تكوين حلقة ثيازول واوكسازول المحفزة بواسطة McbB McbC, and McbD ، (B) الإزالة الحالة للبروتين لفضالة–٢٦ لنهاية N– لطليعة الببْتيد (propeptide).



الإستراتيجيات الجديدة لإيجاد مضادّات حيوية جديدة وإطالة عمرها الزمني

NEW STRATEGIES FOR FINDING NOVEL ANTIBIOTICS AND EXTENDING THEIR LIFETIMES

عدة إستراتيجيات مطلوبة من أجل التوصل إلى مضادّات حيوية جديدة، وتشمل أصناف تركيبية ووظيفية جديدة للتعامل مع الجمهرة البكتيرية المُمْرضة والمتعدِّدة المقاومة للدواء ولتمديد فترة بقاء المضادّات الحيوية الفعالة في معالجة الإنسان إلى أقصى حد ممكن. وتتناول الفصول الثلاثة الأخيرة من هذه القسم الأخير عديداً من المسائل المعاصرة. من أين تأتي المضادّات الحيوية الجديدة؟ هل بإمكاننا تسريع عملية الاكتشاف؟ وهل بإمكاننا أن نبطئ ظهور سلالات المرضات السريرية متعدِّدة - المقاومة من البكتيريا المُمْرضة؟ لقد وفرت ثروة المعلومات الجينية الأخيرة فرصة واضحة لتحديد وإثبات صحة الأهداف المضادة البكتيرية الجديدة وتفحص في طرق - إنتاجية عالية في المختبر، في المقايسات المستندة على الخلية، وفي الحيوانات - للجينات التي تعدُّ ضرورية للنمو أو حيوية للفوعية. والبعض من هذه الطرق تم تحليلها في الفصل الخامس عشر.

من الواضح وجود حاجة ملحة لجزيئات جديدة. وأحد المؤشرات هو أن ننظر إلى الوقت لإدخال أصناف جديدة من العوامل المضادة البكتيرية منذ إدخال أدوية السلفا في ١٩٣٦. ولقد كان هناك صنف رئيس جديد واحد فقط الذي أدخل في الأربعين سنة الماضية، أوكسازوليدينون المصطنع، في عام ٢٠٠٠م. والعديد من الطرائق لاكتشاف جزيئات جديدة تمت مناقشتها في الفصل السادس عشر. وأخيراً، هناك اندماج للمخاوف حول المقاومة الفردية وأسلوب الصحة العمومية للمشكلات العالمية بشان انتشار المرض المعدي ومخازن المقاومة. وهذا يسلط الضوء على الحاجة لأساليب مختلفة لحماية ترسانة المضاد الحيوي وتحسين صحة السكان لأقصى حد ضد الأمراض البكتيرية التي تم تناولها في الفصل الختامي.

1940 1960 1980 2000

Sulfa Drugs 1936

β-Lactams 1940

Chloramphenicol
Tetracyclines 1949

Aminoglycosides 1950

Macrolides 1952

Glycopeptides 1958

Quinolones
Streptogramins 1962

Oxazolidinones 2000

الجدول الزمني لإدخال أصناف جديدة من المضادّات الحيوية في الممارسة السريرية

الفصل الخامس عشر

نظرات جديدة على الأهداف
NEW LOOKS AT TARGETS

تحديد أهداف جديدة من الجينوميات الجرثومية

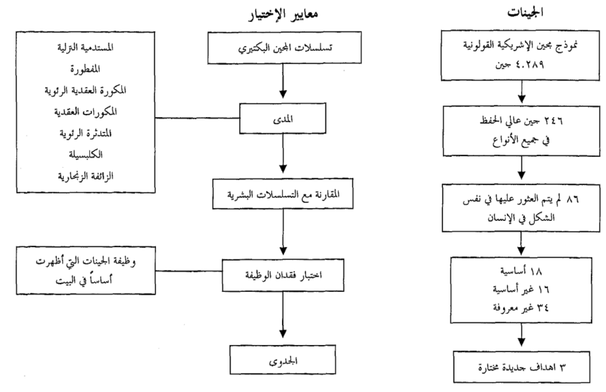
الهدف من إختيارات هدف المضادّات الجرثومية (البكتيرية) المعاصرة لزيادة الفرصة التي يمكن من خلالها إيجاد وتطوير أدوية جديدة إلى أقصى حد يبدأ مع المعلوماتية الحيوية للبحث عن أطر قراءة مفتوحة (open reading frames (ORF)) المحفوظة عبر الكائنات الهدف البكتيرية المحتملة، من كل بكتيريا في الحالة الأكثر عمومية لجميع الكائنات الموجبة - لغرام أو السالبة - لغرام كأصغر الفئات التي ما تزال تستحق الهجوم. ومعيار المعلوماتية الحيوية الثانية المرغوبة هو أن يتم العثور على أطر القراءات المفتوحة انتقائياً في بدائيات النواة وليس في سويات النواة، وبالأخص سويات النواة العليا. المعيار الثالث المتفق عليه عموماً هو اختبار تجريبي هو بأن أطر القراءة المفتوحة ضرورية في واحد أو أكثر من المُمْرضات ذي العلاقة بواسطة بعض الطرد الوظيفي أو أسلوب الاستئصال. تعدُّ الجينات التي تمر هذه الفلاتر أفضل المرشحين للذهاب إلى فحوصات عالية - الإنتاجية لتوليد الضربات الأولية. والفحوصات ربما تشمل مقايسة النشاط الإنزيمي إذا كانت واحدة قد أُنشئت أو ربط الربيطة، مثال، تغيير الفلورية (fluoresecence change) أو الحماية ضد الحراري أو الإتلاف (التمسخ) المحفز - بتشاتروب (chaotrope-induced denaturation). وبما أن المركبات في المكتبات غير محسَّنة، فقط الانجذابات االمعتدلة يتوقع أن تكون في الفحوصات الأولية، وهكذا تتعين التراكيز للكشف عن بعض عتبات (حدود) (threshold) التثبيط أو الربط، مثال، 10 μM. يعاد فحص الضربات الموجبة، ويعاد تصنيعها، وتُختبر في المقايسات الثانوية إذا كانت متوفرة، وبعد ذلك تكون كنقاط انطلاق للكيمياء الموجهة، إما جهود مكتبة صغيرة ومُركّزة وإما تفصيلات جزيء - مفرد لزيادة الفعاليّة في مدى جزء من بليون من المتر (نانومولر) (nanomolar).

تسلسل الجينوم الكامل لمعظم وإن لم يكن لجميع المُمْرضات البكتيرية الرئيسة التي تم العثور عليها خلال السنوات النصف - درزينة الماضية حوَل الأمراض المعدية تماماً في جميع أنحاء المنطقة المستهدفة. من حقل البحث

والتحري الذي كان بشكل فعال هدف ضعيف على مدى العقود الثلاث الماضية (عرقلة الببتيدوغليكان (PG)، تثبيط الريبوسوم، دنا غيراز)، والآن هناك ما لايقل عن الإحراج (العائق) المؤقت لثروات الهدف، مع درزينات إلى مئات من منتجات الجين المرشحة كأهداف جديدة.

التحليل المعلومات الحيوي لأكثرمن ثلاثة درزينات من المجينات الجرثومية المعروفة (كما في يونيو ٢٠٠١م، ٤١ مجين جرثومي أدرج في قاعدة البيانات الجرثومية لمعهد البحوث المجينية (The Institute for Genomic Research's microbial database) للبحث عن الأهداف المعروفة في واحد او أكثر من الكائنات الدقيقة لتكون ضرورية للبقاء على قيد الحياة، عالية الحفظ عبر مدى واسع من المُمْرضات البكتيرية وإما غائبة أو متميزة في البشر (انظر روساموند وآلسوب Rosamond and Allsop, 2000، للمراجعة). واحد القيود لتحديد الجينات المحفوظة غير المعروفة الوظيفة هي فشل الشرح للوظيفة المفترضة بواسطة التناظر (التشابه) ولكن التحسينات في الطرق الحسابية ستواصل قيادة الجينات غير المعروفة إلى كسر (جزء) صغير جداً الذي بالإمكان اختباره تجريبياً. حتى في حالة عدم وجود وظيفة جيدة – الوصف، مختلف النهج الوراثية، مثال الطفرات الحساسة – للحرارة أو الطفرات الموسومة – بالتوقيع، لتسمية اثنين فقط (هينسيل وآخرون Hensel *et al.*, 1995) يمكن أن تنشئ الأساسية للبروتين وتصادق على صحته للفحص. ولاحظ روساموند وآلسوب (Rosamond and Allsop, 2000) مثال (الشكل ١٥,١)، حيث ٤,٢٨٩ جينات من الإشريكية القولونية تمت مقارنتها ضد مجينات سبعة ممرضات تسبب – المرض التنفسي (وتشمل الزائفة الزنجاؤية، المستدمية النزلية، والمكورة العقدية الرئوية) لتعطي ٢٤٦ جينات محفوظة عبر جميع هذه البكتيريا، ومن ضمنها ٦٨ جيناً كان غائباً من البشر. ونصف هذه الجينات (٣٤/٦٨) كانت غير معروفة الوظيفة وقت الحليل، ١٦ إتضح بأنها غير أساسية و ١٨ كانت أساسية، وتشمل الأهداف المعروفة لمضادّات الكوينولونات وماكروليد الحيوية. وفي ضوء المثال المذكور، تم انتقاء ٣ من ١٨ جينات كأهداف للفحص للبحث عن أدوية مضادة بكتيرية جديدة للجهاز التنفسي.

ولقد تم الشروع في تحديد هوية ١٥٠ جيناً أساسياً لقابلية الحياة (viability) في الممرض الأساسي المكورة العنقودية الذهبية جهازياً بواسطة التعبير عن مضاد حسي رنا RNA (antisense) لاستئصال وظيفة الجين (جاي وآخرون Ji *et al.*, 2001) . ولقد تم التعبير عن المضاد الحسي رنا antisense RNA تحت تحكم المحرضات المدفوعة – بتتراسيكلين، كما أن وجود أو غياب تتراسيكلين سمح بالتعبير عن النمط الظاهري المشروط، ويسمح بإنتعاش (استرداد) المنتسخات (النسيلات) (clones) التي توفت في وجود المضاد الحسي رنا antisense RNA. وحوالي ٣٠٪ من الجينات المكوراتية العنقودية التي ظهرت بأنها حرجة كانت غير معروفة الوظيفة، و٣٠٪ كانوا مشابهين للجينات مع الوظيفة المقترحة والـ ٤٠٪ الباقين كانوا جذوع سوية (orthologs) للجينات البكتيرية المعروفة بأنها أساسية.



الشكل (١٥,١). مثال للمنهج المستند – على الجينوميات للأهداف الجديدة للأدوية المضادة البكتيرية في عداوى الجهاز التنفسي. (بالإذن من روساموند و آلسوب Rosamond and Allsop, 2000).

داخل سلالات الإشريكية القولية نفسها سيكون هناك تباين كبير في الجينات التي تستطيع أن تسهم في الإمراضية. ففي *E.coli* O157: H7، ١,٣٨٧ من ٣,٥٧٤ من الجينات (بيرنا وآخرون Perna *et al.*, 2001) تختلف عن سلالة الإشريكية القولونية التي سبق تسلسلها MG1655، التي وُزعت في مئات الجزر الجينية حيث تم خلط دنا بواسطة النقل الأفقي للجينات، ومشددةً على النشوء التأشيبي (recombinational evolution) في المجينات البكتيرية المعوية. وستكون هناك حاجة إلى المزيد من بيانات تسلسل المجين من سلالات الإشريكية القولونية والتوصيف الوظيفي للعديد من ORFs التي ترمز عوامل الفوعة المفترضة (السموم، الالتصاقات، الإنزيمات، أنظمة الإفراز من النوع III ... إلخ)؛ لفرز الأهداف المفضلة في السلالات العالية الإمراضية.

التسلسلات المجينية لسلالات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمشسيلين مرسا (MRSA) N315 وسلالات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوميسين (VRSA) Mu50 من العزلات السريرية في اليابان (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) (انظر الفصل السابع) سمحت برؤية واسعة لأهداف المضادّات الحيوية المحتملة وكشفت عن حوالي ٧٠ مُرشَّحاً (من أصل ٢,٦٠٠ جين) لعوامل الفوعية الجديدة أو الإضافية والتي قد تمكن سلالات المكورة العنقودية الذهبية

المقاومة لتكون مُمْرِضات فعالة للإنسان. وعلى سبيل المثال، اثنان من الببتيدوغليكان ترانسغليكوسيلازات الأحادي الوظيفة (PG monofunctional transglycosylases) المفترض (*sgtA* and *sgtB*) قد تكون أهدافاً لمقايسات لمثبطات جديدة (انظر الفصل السادس عشر)، جنباً إلى جنب مع المشغِل الذي من المحتمل بأن يسمح للمكورة العنقودية الذهبية للنمو عند 3.5 M ملح، المتطابق الجزيء للتسمم الغذائي بواسطة هذه البكتيريا. اثنان من بروتينات ربط القالب خارج الخلية الكبيرة من 722kD، و421kDa ربما تتواسط التصاق المكورة العنقودية الذهبية مع نسيج صمامات القلب في التهاب الشغاف. مجموعة كبيرة من جينات السم الخارجي والسم المعوي تؤوي داخل الجزر الإمراضية في كروموسوم المكورة العنقودية الذهبية، والتي يمكن تقييمها لوظيفة مستضد فائق (ممتاز) (superantigen) في متلازمات الصدمة السمية (toxic shock syndromes)، مرض كواساكي (Kawasaki's disease)، ومختلف الاستجابات الالتهابية التي تسببها هذه الإمراضيات.

وبالمثل، التسلسل الجينومي للسلالة الفوعية من المكورة العقدية الرئوية وقد أدى ذلك إلى اقتراح أهداف جديدة، تشمل بروتينات السطح، كلا البروتينات الدهنية وتلك التي تمت ترسيتها عن طريق عمل سورتاز (sortase)، والتي يمكن أن تكون مرشحة لتطوير اللقاح (تتيلين وآخرون Tettelin *et al.*, 2001). وإنزيم سورتاز هذا في البكتيريا الموجبة — لغرام الذي يرسّي تساهمياً بروتينات الغشاء الخارجي أو السطح إلى PG عند LPXTG زخارف السلسل الأولي سوف يتم مناقشته لاحقاً في هذا الفصل وفي الآونة الأخيرة أجري الأسلوب — المدفوع بالمجينات لتحديد هوية مثل هذه البروتينات مثل مرشحات الفوعية في المكورات العقدية من المجموعة A (group A streptococci) (ريد وآخرون Reid *et al.*, 2001) وتوصلت إلى ١٢ جيناً يُرمزون مثل زخارف LPXTG. نصف الجينات كانت منتظمة في مرحلة الثبات (stationary phase) و٩ من ١٢ نظمت بواسطة عناصر انتساخ جين الفوعية. وأخيراً، في إظهار البروتينات الاثني عشر والتحليل المناعي مع مصل من الأفراد الذين سبق لهم الإصابة بعداوى المكوراتية العقدية المجموعة A، تفاعلت ١٢ من ١٢ من البروتينات، مما يشير إلى الإظهار (التعبير) كمستضدات أثناء كورس العدوى في البشر. وهؤلاء من الممكن أن يكونوا مُرشَحين لتطوير اللقاح و/ أو أهداف مضادة جرثومية.

وبالإضافة إلى تكرارات الأساليب الحاسوبية لتوصيل الجينات الجرثومية الأساسية غير المعروفة مع البروتينات معروفة الوظيفة، الجهود المجينية التركيبية عالية الإنتاجية (إيرلاندسين وآخرون Erlandsen *et al.*, 2000، ميتل وجروتير Mittl and Grutter, 2001) تجري حالياً لحل تراكيب أشعة - إكس للمئات إلى الألوف من البروتينات وتصنيفها حسب أسلوب البناء الملاحظ وأضعافها بدلاً من التسلسل الأولي وتنبؤ التركيب الثلاثي. وفي غياب الوظائف المتوقعة للقياس، هناك مقايسات عالية — الإنتاجية التي لا تتطلب نشاطاً معروفاً أو ربيطة معروفة التي من الممكن تثبيط ربطها بواسطة المركبات المكتشفة والموجهة المحتملة. وعلى الأصح، يمكن للمرء أن يستخدم الربيطات الفلُورية أو التدوير أو الحراري أو حماية الإتلاف لإيجاد مثبطات محكمة الربط في مركب مكتبات

البروتينات غير المعروفة الوظيفة. ومن ثم يمكن اختبار الربيطات المرشحة في فحص كل الخلية لرؤية ما إذا كان هناك تأثير مثبط للبكتيريا أو مبيد للبكتيريا. وبعد ذلك يمكن استعمال المركب الفعال بكفاية لتشريح الآلية (مثال، جدار الخلية، البروتين، أو تثبيط بناء دنا ومن ثم التصفير (zeroing) في خطوات معينة في تلك المسارات). السبيل الثالث لتحديد هوية الأهداف المحتملة هو استخدام رقائق الصف الدقيق للمجين البكتيري (bacterial genome microarray chips)، أوتنميط التعبير الجيني (انظر مك ديفيت ورزينبيرج McDevitt and Rosenberg, 2001، بيرجيو وهوتش Pergeo and Hoch, 2001) لتقييم مستويات Mrna الأكثر وفرة تحت مختلف الظروف، مثال، التعرض للمضادّات الحيوية من مختلف الأصناف، أو المضادّات الحيوي الجديدة، لكتالوج الجين الأكثر تضرراً. وعلى سبيل المثال، تأثيرات إضافة الدواء المضاد للدرن (antitubercular drug) على إظهار جين المتفطرة السلية (*Mycobacterium tuberculosis*) قد تم تقييمه (ويلسون وآخرون Wilson *et al.*, 1999) على رقائق دنا تغطي ٩٧٪ من مجين الدرن وترفع إنزيمات البناء الحيوي للحمض الدهني (fatty acid cynthetase) وتريهالوز دي ميكوليل ترانسفيراز (trehalose dimycolyltransferase) (انظر الشكل ١٥,٢٠ و ١٥,٤، بالترتيب) الملاحظة.

يصور الشكل (١٥,٢) عملية نموذجية من ثلاث مراحل للأساليب المستندة على المجينات نحو الأدوية المضادة الجرثومية، وتشمل إختيار الهدف، تحديد هوية المركبات الموجهة، والموجهات المثلى (روساموند وآلسوب Rosamond and Allsop, 2000).

وإكمالاً للنهج الجيني لتحديد الجينات الأساسية هي المقايسات للجينات المطلوبة للمُمْرضات البكتيرية لإنشاء العداوى في الفقاريات . وبذلك فهناك مجموعات من الجينات يمكن الاستغناء عنها في البكتيريا التي تنمو في أطباق بتري (petri plates) التي أصبحت ضرورية لهم للبقاء في العداوى في الحيوان والإنسان. وأحد الأساليب لتحديد الجينات التي تم اظهارها انتقائياً في الجسم الحي والمطلوبة للفوعية البكتيرية هي تقنية الإظهار (التعبير) في الجسم الحي (ماهان وآخرون Mahan *et al.*, 1993، ماهان وآخرون Mahan *et al.*,1995)، التي تثري البكتيريا التي تشغل جينات معينة التي تساعدها على البقاء والتكاثر (التضاعف) أثناء العداوى في الحيوانات (انظر شوبرا وآخرون Chopra and Roberts,1997). وعلى سبيل المثال، تشمل هذه الجينات التي تشغل البناء الحيوي وإعادة الامتصاص الموجه لمستخلب الحديد البكتيري بما أن المضيفات الفقارية تملك جميع الحديد المتاح مقيد بين الخلية أو مرتبط مع ترانسفيرين (transferring) في الفراغات خارج الخلية. ويبقى أن نرى إذا كانت المضادّات الحيوي التي تستهدف جينات الفوعية سوف تكون فعالة في العيادة وهل سيكون هناك انخفاض في تواتر تطوّر المقاومة.

لقد تم حديثاً وصف استعمال مُحرِضات تتراسيكلين لتوليد الأنماط الظاهرية المشروطة لتثبيط رنا antisense للجينات الأساسية لتشغيل ١٥٠ جيناً في المكورة العنقودية الذهبية (جاي وآخرون Ji *et al.*, 2001). ولقد تم هندسة السلالات البكتيرية لتنظيم مستويات الإظهار للجينات المستهدفة (انظر ترایاس ويوان Trias and Yuan, 1999)؛

لزيادة الحساسية للبروتين المُظهر للمثبطات المرشحة. وقد عثر دي فيتو وآخرون (DeVito *et al.*,2002) على صفوف لفحص سلالات ذات هدف – محدد تمت هندستها لتعظيم الحساسية للبروتينات المستهدفة مثل إنزيمات هليكازات دنا DNA helicases، البروتين الحامل لإينوا أسيل ريدكتاز (enoyl-acyl carrier protein reductase) (ACP)، دنا غيراز، دايهيدرو فوليت ريدكتاز (dihydrofolate reductase)، ومنتج جين MurA (الفصل الثالث) للفحص الموازي.

توخي الموجهات المثلى ← تحديد المركبات الموجهة ← تطوير الفحص ← إختيار الهدف

	تفرقع (توليد) الموجهات وتوخي الموجهات المثلى	الفحص الفائق الإنتاجية	نشاط الإنزيم المحدد ربط الربيطة	تحديد هوية الأهداف المحتملة (منتجات الجين الأساسية أو الفوعية)
الأدوية المرشحة	القوة في المرض	المقايسات الثانوية / MOA	المسوخ غير النوعي التدوير الحراري	التحقق من الهدف
	الحركيات الدوائية علم السموم المبكر	المركبات المكتشفة المركبات الموجهة	لا يوجد: الفحص بواسطة مكتبة المركبات الفلورية	اختيار الهدف

الشكل (١٥,٢). الأساليب الجينية للأدوية المضادة الجرثومية. (بالإذن من روساموند وآلسوب Rosamond and Allsop, 2000).

نظرات جديدة لبعض الأهداف القديمة

وبينما يجري التوصل إلى أهداف جديدة بواسطة الاستقصاءات المدفوعة – بالجينات، الزيادة في المعلومات الجزيئية حول التراكيب الجرثومية والماكينة الجزيئية لتوفير سبل جديدة لتطوير المضادّات الجرثومية مع التركيز على جوانب مختلفة للأهداف المعقدة والمقايسات المحسّنة وتعزيز النوعية والإنتاجية.

أولاً، لاحظنا بعض المظاهر في مناطق الهدف التقليدي الموثق في البناء الحيوي لجدار الخلية، البناء الحيوي للبروتين، وتكرار وترميم الـ دنا ومن ثم تحديد بعض الأهداف غير التقليدية التي تستحق اهتمام جديد. ولقد راجع بوول Poole, 2001، ملك ديفيت وروزينبيرج McDevitt and Rosenberg, 2001، وشوبرا وآخرون Chopra and Roberts, 1997 بعض من هذه الإستراتيجيات.

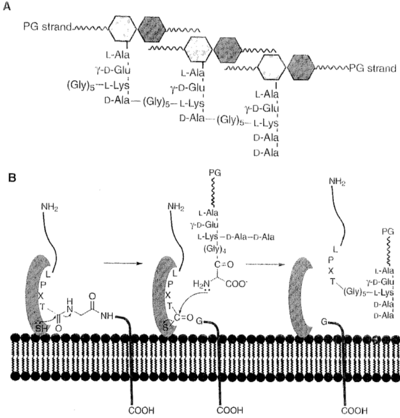
مثبطات البناء الحيوي لجدار الخلية

توجد العديد من التطوُّرات في مجال جدار الخلية وغشاء الخلية التي تستحق البحث.

سورتاز المكوراتية العنقودية وA85 المتفطري (staphylococcal sortase and mycobacterial A85)

في البناء الحيوي لطبقة الببتيدوغليكان للمكورات العنقودية المُمْرِضة، الجسر التبادلي للبِبْتيد البيني (interpeptide cross bridge) ليس مباشراً بين Lys_3 على سلسلة واحدة و$D\text{-}Ala_4$ على سلسلة البِبْتيد المجاورة، ولكن يشمل جسر جليسين الخماسي (pentaglycin bridge) (الشكل ١٥,٣ A). وتوضع هذه الجليسينات (glycines) في

الداخل بواسطة جينات *fem* التي تعدُّ أهداف مساعدة في MRSA (بيرجر باتشي وتشريسكي Berger-Bachi and Tschierske, 1998، على الرغم من أنه لم يتم بعد العثورعلى مثبطات محددة. وبروتينات السطح المستضدية الرئيسة، بروتين M من المكورة العقدية القيحية *(S.pyogenes)*، العامل المسبب لالتهاب البلعوم (pharyngitis) والآفات الجلدية، وبروتين A من المكورة العنقودية الذهبية، تربط تساهمياً مع جسرغليسيل الخماسي (بنتاغليسيل) (pentaglycyl bridge) خلال شطر LPET- لنهاية C– للبِبْتيد الرباعي (C-terminal tetrapeptide-LPET moiety) (نافاري وتشينويندNavarre and Scheenwind, 1999). وأظهر تسلسل مجين سلالة N315 MRSA (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) كثير من بروتينات السطح التي تعدُّ ركائز لسورتاز ويحتمل بأن لها وظائف التصاق (adhesion)، ترتبط مع بروتينات القالب الخارج الخلية في أنسجة المضيف وتمكَن المكورة العنقودية الذهبية بأن تسبب التهاب العظم والنقي (osteomyelitis) والتهاب المفصل الإنتاني (septic arthritis). عرقلة إنزيم الإرتباط التساهمي، المسمى سورتاز، ربما تكون إستراتيجية واعدة لتقليل الفوعية في العداوى المكوراتية العنقودية. وإنزيم سورتاز، الذي تم تحديد تركيبه حالياً وبذلك قد يساعد تصميم الدواء المستند على – التركيب (إلانجوفان وآخرون Ilangovan *et al.*, 2001)، هو ترانسببتيداز (transpeptidase)، يعمل على الفراغ حول – الجبلة مع نوعية لطلائع بروتينات سطح – الخلية للبكتيريا الموجبة –لغرام التي لها تسلسل LPXTG بحوالي ٣٠ – ٤٠ فضالات من النهاية C للبروتين (مازامانيان وآخرون Mazamanian *et al.*, 1999). ويفلق سورتاز الطليعة (الشكل B١٥,٣) عند رابط ببتيد T-G، مطلقاً قطعة (شظية) النهاية C– ومولداً إنزيم أسيل التساهمي. ويؤسر وسيط acyl-LPXT هذا بواسطة مجموعة امينو من سلسلة Gly_5 من خيط ببتيدوغليكان، محرراً الإنزيم لدورة ترانسببتيداز حفَازة أخرى، ويقيد تساهمياً سلسلة البروتين مع خيط الببتيدوغليكان خلال جسر غليسين الخماسي. ونظراً لأن سورتاز يستعمل نفس نوع منطق التفاعل كترانسببتيداز الحساس للبنسيلّين، فإنه ينبغي أن يكون من الممكن التوصل إلى مثبطات فعالة ومحددة لسيستين هيدروليز نشط –الموقع (active-site cysteine hydrolase) (تون – ذات وآخرون Ton-That *et al.*, 1999). ولقد كشف تحليل المعلوماتية الحيوية (بالين وآخرون Pallen *et al.*, 2001) عن توزيع واسع النطاق لسورتازات المفترضة وركائز (مواد) بروتين سورتاز في البكتيريا الموجبة – لغرام وسورتازات المتعدِّدة داخل المجينات. ويتوقع بأن يكون لمجين المتسلسلة كوليكولرسبعة سورتازات مما يوحي إما بتداخل جزئي لرسو ترانسببتيداز سطح – الخلية للبروتينات وإما وظائف أخرى.



الشكل (١٥,٣). عمل سورتازليقيد تساهمياً بروتينات الغشاء الخارجي إلى تمديدات جليسين الخماسي على خيوط ببتيدوغليكان للمكورة العنقودية الذهبية: (A) خيوط ببتيدوغليكان المحتوية على جليسين الخماسي، (B) إنفلاق تسلسل LPTXG في ركائز البروتين الطليعة وترانسببْتيديشن بواسطة سورتاز. (بالإذن من مازامانيان وآخرون Mazamanian *et al.*, 2001).

وفي منطق جزيئ مشابه، ربما يكون أسيل ترانسفيراز في البناء الحيوي لجدار الخلية في المتفطرة السلية لتريهالوز داي ميكوليت (trehalose dimycolate) (الشكل ١٥,٤ A) هدف جديد واعد للمعالجة لمضادّات الدرن. يكوَن المعقد المكون من ٣٠- إلىkDa - ٣٢ ميكوليلترانسفيرازات (mycolyltransferases) (Ag85A,B,and C) (بويتش وآخرون Puech *et al.*, 2000) مكونات بروتين رئيسية لجدار الخلية المتفطرية الشمعي. ويبدو بأنها تعمل كبروتينات رابطة لنيكتين الليفي (فيبرونيكتين) (fibronectin) لمساعدة المتفطرات لدخول الخلايا البلعمية الكبيرة (macrophages). كما أنها تنقل السلسلة–الطويلة ألفا–ألكيل (α-alkyl)، وسلاسل بيتا–هيدروكسي أسيل الدهني (β-hydroxy fatty acyl) (الميكوليل) (the mycolyl) إلى 6-OH لتريهالوزالسكريد الثنائي (disaccharide trehalose) لتنتج ترهالوز ميكوليل الثنائي (dimycolyl trehalose)، عن طريق وسيط تريهالوز أحادي ميكوسيل (monomycosyl trehalose intermediates)، عند السطح الخارجي لجدران الخلية (الشكل ١٥,٤ B) (ساثيمورثي وتاكاياما Sathymoorthy and Takayama, 1987). وعرقلة النشاط الإنزيمي هذا قد يزيل حاجز النفاذية الرئيسي تجاه عدد من المضادّات الحيوية.

وكشف تحليل أشعة – إكس لـ Ag85C بأنه عضو من العائلة العليا سيرين ألفا، بيتا هيدرولاز (α,β-hydrolase) ذات الموقع النشط–سيرين. وهذا يتوقع وسائط إنزيم mycolyl-*O*-Ser acyl enzyme intermediates، مثل ترانسببتيدازات لجدار الخلية وسورتازات المذكورة أعلاه، التي بالإمكان إستهداف تشكيلها وكسرها ميكانيكياً. والإستراتيجيات الرامية لمعوقات تفاعلات Ag85-fibronectin ربما تكون مبينة أيضاً.

تملك المتفطرات جسور أرابينوجالاكتان (arabinogalactan bridges) التي توصل طبقة الببتيدوغليكان مع أحماض ميكوليك (الأحماض الفطرية) (mycolic acids) (بيرسا وآخرون Bersa *et al.*, 1995) الذي فيه يكون جالاكتوز (galactose) في الحلقة–الحرة فيورانوز (free-ring furanose (Gal$_f$) بدلاً من الشكل الشائع بيرانوز ذا الست – حلقات (six-ring pyranose). الصلة بين سلاسل أرابينوجالاكتان وطبقة ببتيدوغليكان يتم توفيرها بواسطة 1,3-L- rhamnosyl-GlcNAc disaccharide، والإنزيمات التي تحوّل dTDP-D-glucose إلى dTDP-L-rhamnose ربما تكون الأهداف المضادة البكتيرية في المتفطرة السلية (ما وآخرون Ma *et al.*, 2002). يعتبر الإنزيم البنائي الحيوي UDP-جالاكتزبيرانوز ميوتاز (UDP-galactopyranose mutase) أساسي لعيوشية (حيوية) الخلية في المتفطرة سميجماتيس (*M.smegmatis*). ويوجد Gal$_f$ كذلك في مستضدات -O لسلاسل عديدالسكريد الدهني للغشاء الخارجي من البكتيريا السالبة – لغرام. ولقد تم حل تركيب أشعة – إكس لميوتاز (mutase) من الإشريكية القولونية (ساندرز وآخرون Sanders *et al.*, 2001)، موفراً نظرة ثاقبة لحفّاز فلافوبروتين هذا وإعداد المرحلة لفحص وتصميم المثبط.

A

R= $(H_2C)_{23}$ H_3C $(CH_2)_{18}$ $(CH_2)_{14}$ CH_3 $(CH_2)_{17}$

B

Monoacyl Intermediate

Bisacylated Product

الشكل (١٥،٤). عمل إنزيم المتفطرة السلية ميكوليل ترانسفيراز Ag85: (A) تريهالوز دايميكوليت، (B) تفاعل نقل ميكوليل.

GlmU: الإنزيم ثنائي الوظيفة المولِّد UDP-GlcNAc

لاحظنا في الفصل الثالث بأن فوسفوميسين يثبط الإنزيم الأول في مسار البناء الحيوي لببتيدوغليكان. وMurA الذي يحفز عملية إينول بيروفيشن (enolpyruvylation) لمسار تصنيع سكر نيوكليوسايد UDP-GlcNAc. ويُنتج UDP-GlcNAc في تسلسل — خطوتين (GlmU) من جلوكوسامين- P-1 (glucosamine-1-P)، الذي بدوره يتولد من المستقلب الأولي fructose-6-P (بواسطة الأمَّنة من المادة المشاركة جلوتامين (GlmS) وبعد ذلك تحويل glucosamine-6-P إلى glucosamine-1-P بواسطة GlmM mutase) (للمراجعة، انظر فان هيجينورت van Heijnoort, 2001b). يعدُّ الإنزيم GlmU ثنائي الوظيفة في العديد من البكتيريا، مع حقلين مستقلين، الذيْن يحفزا أولاً N-acetylation، عن طريق acetyl-CoA، ومن ثم نقل الشطر UDP فوق ١-فوسفيت لينتج UDP-GlcNAc (جيهرينج وآخرون Gehring et al., 1996). وبسب أن UDP-GlcNAc هو المستقلب الرئيس، فالجين الأساسي هو *glmU*، وفي البكتيريا السالبة-لغرام يعد UDP-GlcNAc مستقلب نقطة الفرع، ويعمل كطليعة لكل من البناء الحيوي لببتيدوغليكان ومكونات الغشاء الخارجي: الدهن A وسلاسل مستضد -O. وحتى الآن لم يتم العثور على مثبطات نوعية فعالة لأي من نشاط حقل أسيل ترانسفيراز أو نشاط حقل نقل يوريديليل (uridylyl) لـ GlmU. ولقد تم وصف التركيب الكريستالي (crystal structure) لمثلوث GlmU(trimer GlmU) للمكورة العقدية الرئوية (كوستريوا وآخرون Kostrewa *et al.*, 2001)، مجيزاً طرق التركيب/الوظيفة وكذلك الفحص.

ترانسغليكوزيلازات (Transglycosylases)

في حين أنه كان معروفاً لسنوات بأن ترانسغليكوزيلازات كانت عناصر حاسمة للمرحلة — الأخيرة من البلمرة (late-stage polymerization) لوحدات ثنائي سكريل البِبْتيد الخماسي (disaccharyl pentapeptide) إلى خيوط ببتيدوغليكان الموجودة، فقد كانت أقل دراسة كصنف؛ بسبب عدم توفر المواد للمقايسة؛ وبسبب طبيعتها المرتبطة - بالغشاء، الذي جعل تنقيتها وتوصيفها صعباً (انظر فان هيجينورت van Heijenoort, 2001a، للمراجعة). ولقد بين تسلسل المجين أربعة ترانسغليكوسيلازات في الإشريكية القولونية وأعداد مقارنة في المُمْرضات الأولية، بعضها كترانسغليكوسيلازات/ترانسببتيدازات ثنائية الوظيفة وبعضها كترانسغليكوزيلازات أحادية الوظيفة. وبعض التقارير الأخيرة، التي تسلط الضوء على مجالين من التطور تجدرالإشارة إليها.

أولاً، الطرق الكيميائية الإنزيمية المشتركة من إس. والكر (S.Walker) وزملائه، مستعملاً مناظرات الدهن I (الفصل الثالث) وMurG glycosyltranferases، قد سمحت بالوصول إلى lipid-disacchride-pentapeptide lipid II analogs المتنوعة (الشكل ١٥،٥) التي يمكن ان تستخدم لفحص تسرانسغليكوسيلازات المرتبطة — بالغشاء (يي وآخرون Ye *et al.*, 2001). وعلى وجه الخصوص، سلسلة الدهن C_{35} مع وصلات 4-*cis*-olefinic كانت نشطة، كانت أقل عرضة للتجميع من سلسلة أيزوبرينويد C_{55} isoprenoid الطبيعية، واقتُرح بأنه من الممكن إنشاء بروتوكول

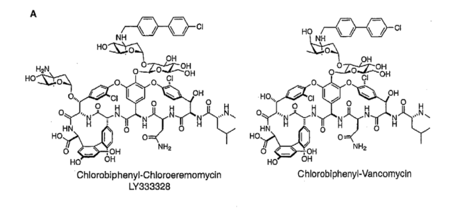
فحص مفيد لاختبار المواد والمثبطات. وسينثيسازات لمناظرات الدهن II الإضافي (كوديك واوتفوس Cudic and Otvos, 2002) والدهن II نفسه (فان نيووينهز وآخرون Van Nieuwenhze *et al.*, 2002) سوياً مع تصميم المقايسات (الاختبارات) المحسَّن (شوارتز وآخرون Schwartz *et al.*, 2001) توعد بتحريك الحقل. والوجه الثاني هو أن المنتج الطبيعي موإينوميسين (moenomycin) (الفصل الثالث) تثبط ترانسغليكوزيلازات، ومقايسات الإزاحة (التبديل) من السهل إنشائها للفحص (فولمر وهولتجي Vollmer and Holtjie, 2000). لاحظنا في الفصل الثالث عشر بأن تيكوبلانين هو غليكوببتيد دهني طبيعي، أُسل على مجموعة غلوكوسامين أمينو (glucosamine amino group) على قمة غليكوببتيد (الشكل ١٣،٢٦). مشتقات *N*-aryl النصف إصطناعية، مثل كلوروبيفينيل فانكوميسينات (chlorobiphenyl vancomycins) وكلوروإرموميسيات (الشكل ١٥،٦ A) هي حوالي ٨٠–ضعفاً أكثر نشاطاً ضد المكورات المعوية المقاومة–لفانكوميسين (VRE) من الغليكوببتيدات الأبوية. ونظراً لأن *N*-aryl glycopeptides لا تربط N-acyl-D-Ala-D-Lac أكثر إحكاماً من فانكوميسين أو كلوروإرموميسين، فقد افتُرض بأنهم يبحثون عن هدف ثان (جي وآخرون Ge *et al.*,1999، سن وآخرون Sun *et al.*, 2001). وفي الواقع، فتدمير موقع ربط N-acyl-D-Ala-D-Ala/D-Ala-D-Lac بواسطة إزالة N-MeLeu$_1$ (الشكل ١٥،٦ B) يحافظ على النشاط ضد VRE. ولقد اقترح كاهني وزملاء العمل بأن تسرانسغليكوسيلازات يمكن أن تكون الأهداف الإضافية (جي وآخرون Ge, *et al.*, 1999)، الفرضية التي من شأنها فتح سبل جديدة لانعكاس VRE. الجين المسئول عن حساسية خلايا الإشريكية القولونية لمشتقات الدهن السكري (glycolipid) من فانكوميسين ولكن ليس فانكوميسين نفسه، كما تم تأكيده في الآونة الأخيرة (إيجيرت وآخرون Eggert *et al.*, 2001)، مما يصادق على الأساس الجزيء للتميز. وكذلك، مشتقات *N*-aryl من فانكوميسين الراهبة للماء النشطة ضد VRE والتي تثبط نشاط ترانسغليكوزيلاز في المختبر (سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 2001) قد استُعملت في استشراب الانجذاب (affinity chromatography) لعزل فرعية من بروتينات غشاء الإشريكية القولونية، وتشمل البروتين المرتبط بالبنسيلّين PBP6وB(PBP1B),PBP2,PBP3,PBP5، متناسقة مع ترانسغليكوزيلازات كأهداف.

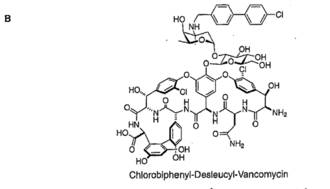
القدرة على إنتاج مكتبات كبيرة من الكربوهيدرات بواسطة الاصطناع (synthesis) (بيزمان وآخرون Baizman *et al.*, 2000) قد يؤدي إلى ربيطات (ligands) ذات نوعية وفعاليّة لتثبيط ترانسغليكوزيلاز. تركيب ترانسغليكويلاز الانحلالي (الذوباني) من الإشريكية القولونية، SLT$_{35}$، الذي يشارك في إطلاق ببتيد موراميل اللاّمائي (anhydromuramyl peptide) بواسطة الهجوم بين الجزيئات لـ C$_6$-CH$_2$OH على رابط C$_1$ غليكوسيد (C$_1$ glycoside link) أثناء الإشارات المستحثة – بيتا لكتاميز (فان أسيلت وآخرون van Asselt *et al.*, 2000)، قد تم حله وربما يكون نموذجاً بدئياً (protoptype)؛ لتصميم ونشوء مثبطات غليكوزيلاز.

D-Ala
D-Ala
DAP
γ-D-Glu
L-Ala
AcHN
AcHN
OH
RO
Lipid II Analog

R Group	Chain Length
	10
Farnesyl	15
Geranylneryl	20
Betulaheptaprenyl	35
Solanesyl	45
Undecaprenyl	55

الشكل (١٥,٥). نظيرات ركازة الدهن II المحددة لمقايسة ترانسغليكوسيلاز الغشاء.





الشكل (١٥,٦). نظائر كلوروفينيل من كلوروإرموميسين وفانكوميسين النشطة ضد VRE: (A) المركبات النوعية، ضد (B) أريل جليكوبِبْتيدات النشط ضد VRE مع تدمير موقع الربط د- الآنين-د-الآنين D-Ala-D-Ala.

مثبطات البناء الحيوي للبروتين

في المنطقة المستهدفة الكلاسيكية الثانية للأدوية المضادة البكتيرية، وتثبيط تصنيع البروتين، هناك أيضاً عديد من الفرص لمزيد من البحث عن أهداف مضاد حيوي جديدة.

المضادّات الحيوي المستهدفة ضد الريبوسوم

من المؤكد بأن تراكيب أشعة-إكس للوحدات الفرعية الريبوسومية 30S و 50S ومعقدات 70S الكاملة (الفصل الرابع) تساعد في تطوير المقايسة ونشوء مضادّات حيوية جديدة التي ترتبط عند كل من المواقع الكلاسيكية والمواقع غير الكلاسيكية في أي من جزيئات 16S أو 23S rRNA، التي تشكل معاً ثلثي كتلة الريبوسوم.

تشمل منطقة الحقل V من 23S rRNA مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) من الموقع ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) إلى بداية نفق الخروج لسلسلة عديد الببْتيد الوليدة (بان وآخرون Ban *et al.*, 2000، نيسين وآخرون Nissen *et al.*, 2000) ويشمل موقع الربط لكل من ماكروليد إريثروميسين العضوية -١٤ وتيلوسين ماكروليد الحلقة العضوية -١٦ (دوثويت وآخرون Douthwaite *et al.*, 2000، بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2000).

كما أنها تتداخل جزئياً مع المضادّات الحيوية الخرى مثل ستربتوجرامينات ولينكوساميدات، وعلى سبيل المثال، كلنداميسين. التصميم المستند على - التركيب للمضادّات الحيوي الجديدة التي تملأ واحداً أو أكثر من مواقع رنا الفرعية هذه ينبغي أن تكون مشروع إنتاجي. ويبلغ طول نفق خروج الببْتيد حوالي 100 Å (انظر نيسين وآخرون Nissen *et al.*,2000)، مبطنة معظمها برنا من الحقول I إلى V من 23S rRNA ولكن أيضاً مع بعض الإحتكاكات من البروتينات L4, L22 و L39. وإذا ما كان بالإمكان إيجاد المثبطات التي تملأ النفق فذلك غير واضح، ولكن يجدر الذكر بأن الدواء المضاد للالتهاب غير الستيرويدي (nonsteroidal) فلوربايبروفين (flurbiprofen) يعوق النفق في داخل الموقع النشط للخمائر الأكسيجينية الدورية لبروستاجلاندين سيكلواكسيجينازات (prostaglandin cyclooxygenases) (سيلينسكي وآخرون Selinsky *et al.*, 2001).

يبدو بأن مايكروليد كاربوميسين (carbomycin) يرتبط بشكل مختلف قليلاً عن إريثروميسين بما أن، خلافاً للإريثروميسين، فإنه يثبط تفاعل ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) الفعلي في مقايسات نقل أمينو أسيل إلى بيوروميسين (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2001). تصل سلسلة السكر الممتدة على C_5-OH من هيكل ماكروليد كاربوميسين للخلف نحو مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) رنا (هانسين وآخرون ٢٠٠٢). إثنان من المضادّات الحيوية المستخدمة في الطب البيطري، تياميولين وفالينميولين (tiamulin and valenmulin)، المشتقات الشبه إصطناعية للمنتج الطبيعي بليوروميووتيلين (pleuromutilin) (الشكل ١٥,٧)، قد يكونا نقطتا البداية لتحديد هذه الأهداف أكثر. ويظهر تياميولين وفالينميولين آثار الأقدام التي تؤثر في النيوكليوتيدات في الحقل V من 23S rRNA

التي تورطت كجزء من مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) الديناميكي المتحرك (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2001)، وكذلك يعرقلا بالكامل تكوين رابط البِبْتيد. وهؤلاء يتنافسون مع كاربوميسين ولكن ليس إريثروميسين، مما يوحي بأن كلاً من بليوروميوتيلينات وإريثروميسين بإمكانهما الربط في الوقت نفسه في المواقع المجاورة ولكن غير المتداخلة. وربما يتداخل بليوروميوتيلينات مع بريستيناميسين IIA (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2001)، مشيراً بأنه سيكون هناك تحليل مثمر في خريطة التركيب - الدقيق للمضادّات الحيوية في وحول مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية 50S مع احتمال تصميم تراكيب تجميعية للمضادّات الحيوية.

Pleuromutilin Tiamulin Valnemulin

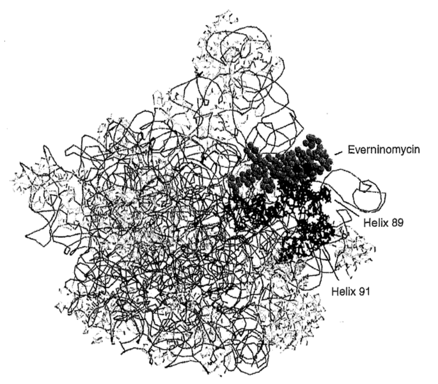
الشكل (١٥,٧). تراكيب أعضاء عائلة بليوروميوتيلين التي تعرقل مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) على الريبوسوم.

المثال على وجود مواقع الريبوسوم غير الكلاسيكي لربط المضاد الحيوي يتم توفيره من قبل الدراسات الحديثة على المنتج الطبيعي إيفرنينوميسين (everninomycin) (الشكل ١٥,٨)، عضو من أحادي السكريد أورثوسوميسينات (oligosaccharide orthosomycins) (بيلوفا وآخرون Belova *et al.*, 2001).

يعدُّ إيفرنينوميسين سكريد ثماني (octasaccharide) مغطى عند كلا النهايتين بواسطة إيسترات فينوليك أريل كاربوكسيليك (phenolic aryl carboxylic esters). ويرتبط مع 23S rRNA بعيداً عن مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) الذي يعد الهدف للميكروليدات وستربتوجرامينات. واستخدمت الطفرات المقاومة لتحديد ربط إيفرنينوميسين عند الحلقات ٨٩ و ٩١ (الشكل ١٥,٩) وربما تعرقل ربط بروتين عنصر البدء IF2، الذي يجلب المبادر (initiator) فورميل ميثيونيل (formylmethionyl) (Met) (Trna). ولاحظ بيلوفا وآخرون Belova *et al.*, 2001 بأن هذا موقع متميز من المضادّات الحيوية المعروفة التي ترتبط - بالريبوسوم والتي تستهدف مراكز ببتيديل ترانسفيراز وموقع الخروج لسلاسل البِبْتيد الناشئة. وقد يكون هذا الموقع هدف جيد للجزيئات الصغيرة الأخرى، التي بالإمكان قياسها بواسطة إزاحة إيفرنينوميسين. ويستعمل إيفرنينوميسين كمُحرض لنمو الحيوان؛ بسبب أن سميته قد حدت تطوُّره في الإنسان، ولكن المتغيرات غير السامة المستندة على معلومات من هذا القبيل ربما تكون ممكنة.

Everninomycin

الشكل (١٥,٨). تركيب إيفرنينوميسين.



الشكل (١٥,٩). موقع ربط إيفرنينوميسين على 23S rRNA. (بالإذن من مازمانيان وآخرون Mazmanian *et al.*,2001).

الصنف الثاني من المنتجات الطبيعية التي تعمل كمضادّات حيوية بواسطة إعتراض واحد من البروتينات التي تعمل كشريك للريبوسوم أثناء البناء الحيوي للبروتين هو صنف ثيوبِْتيد (thiopeptide class)، ممثلاً بواسطة

GE2270A ، ثيوستربتون (thiostrepton)، ونوسيهيبتيد (nosiheptide) (الشكل ١٥,١٠) (انظر سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999 ، للمراجعة). تحتوي الببتيدات غير الريبوسومية هذه على فضالات Ser و Cys ، والتي تم إزالة الهيدروجين من الحلقة (cyclodehydrated) وإزالة الهيدروجين (dehydrogenated) لإيجاد نظم حلقة ثيازول وثيازولين، وأوكسازولين (thiazole,thiazoline,and oxasoline ring systems) التي تدخل الصلابة. يستهدف ثيوستربتون ونوسيهيبتيد 23S rRNA في المنطقة A_{1087} ، إضافة إلى عرقلة ربط عنصر الإطالة EF-G إلى الريبوسوم عند موقع ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل). ويعرقل ثيازول ببتيد GE2270A نقل بِبْتيديل –المتواسط بالريبوسوم بواسطة GTPase EF-Tu ، بروتين تشابيرون (chaperone protein) الذي من شأنه أن يوصل aminoacyl-tRNAs إلى رامزات mRNA عند موقع ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) (انظر الفصل الرابع). ويرتبط المضاد الحيوي مع معقد EF-Tu complex ، ويشدد ربط GTP ، يباطئ عمل GTPas ، ويمنع تكوين معقد EF-Tu-GDP القابل للإطلاق، مماطلاً عملية إطالة ببتيد الريبوسوم (الشكل ١٥,١١). ولقد تم تحديد تركيب أشعة–إكس لمعقد EF-Tu-GE2270A (آنبورج وبارميجياني Anborgh and Parmeggiani, 1991)، وبشكل عام، يوفر EF-Tu مواقع متعدِّدة للتفاعل مع المضادّات الحيوي الأخرى، وتشمل بولفوميسين وكيروميسين) (pulvomycin and kirromycin) (انظر سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999). وتشير هذه النتائج بأن البرنامج الأمثل المستند – على التركيب ضد EF-Tu ربما يكون مجدياً. اتباعاً لموضوع المضادّات الحيوية التي تستهدف تسلسلات رنا، فقد إستعرض سوتشيك وونج (Sucheck and Wong, 2000) السبل الحديثة لتصميم واختبار الجزيئات الصغيرة التي تتفاعل مع تسلسلات معينة في mRNA و rRNA.

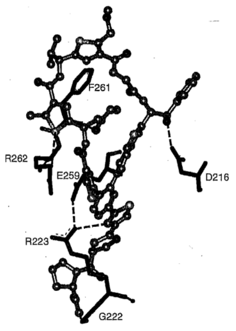
يقدم تفاعل أمينوغليكوسيدات مع 16S rRNA وكلاهما من أشعة – إكس ودراسات التصوير بالرنين المغنطيسي النووي (nuclear magnetic resonance imaging studies)، نموذج مستند – على التركيب لتصميم جزيئات جديدة. ولقد إستعمل في النهج التكميلي، وونج وزملائه (سوتشيك وآخرون Sucheck *et al.*, 2000) نيامين تترا–امينو داي سكاريد (neamine tetra-amino disaccharide) (الشكل ١٥,١٢) كعنصر أساسي لتحقيق محددات الربط لـ 16S rRNA. وإرتبطت مثنويات نيامين (dimmers of neamine) لتنتج أمينوغليكوسيد إصطناعي ثنائي التكافؤ مع خواص مبقية على الإنجذاب العالي لـ rRNA والتمييز المنخفض بواسطة الإنزيمات – المعدلة للأمينوغليكوسيد (aminoglycoside-modofication enzymes). وتتيح روابط *N,N'*-methyl diamine linkers البسيطة (الشكل ١٥,١٢) نشاط ربط ومع ذلك كانت مواد فقيرة لتعديل أسيل ترانسفيرازات (acyltransferases) وفوسفوترانسفيرازات (phosphotransferases) التي تبطل نشاط أمينوغليكوسيدات. وهذه نقطة بداية واعدة للسبل الجديدة لمحاكيات أمينوغليكوسيد.

GE2270A

Nosiheptide

Thiostrepton

الشكل (١٥,١٠). أمثلة على صنف ثيوبِبْتيد من المضادّات الحيوية التي تحتوي على حلقات ثيازول وأوكسازول.



الشكل (١٥,١١). موقع الربط لثيوبِبْتيد **GE2270A** على عنصر الإطالة **EF-Tu** (بالإذن من هيفرون وجورانك **Heffron and Jurank,2000**).

	16S RNA A-Site K_d (μM)	*E. coli* MIC (μM)	AAC-(6') K_m (μM)	APH-(2") K (μM)
Neomycin B	0.2	3.1	3.64 X 10⁵	1.9 (K_m)
	1.1	31	1.6 X 10⁴	0.78 (K_i)
	0.8	125	2.26 X 10⁴	0.15 (K_i)
	0.04	6.25	9.26 X 10³	0.94 (K_i)

R = Neamine

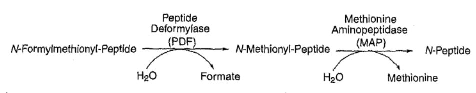
الشكل (١٥,١٢). المثنويات الإصطناعية من مشتقات نيامين مثل محاكيات الامينوغليكوسيد المستهدف – رنا.

ببتيد ديفورميلاز وميثونين أمينوبِتيداز

(Peptide deformylase and methionine aminopeptidase)

يبدأ البناء الحيوي للبروتين البكتيري مع fMet tRNA كبادئي لأمينوأسيل-tRNA، مرافق لمركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) على الريبوسوم بواسطة بروتين تشابيرون IF2 الملاحظ سابقاً. ويكفل فورميلة –ن -N formylation لمجموعة مثيونيل أمينو (methionyl amino group) بأن fMet يستطيع أن يعمل فقط كمانح وليس كمستقبل في تكوين رابطة البِتيد، فارضاً اتجاهية على عملية البدء. وبمجرد ظهور سلسلة البِتيد المطيل من الريبوسوم، تزال مجموعة N-formyl إنزيمياً بواسطة الإنزيم المعروف بيبتيد ديفورميلاز (peptide deformylase) (هنتينجتون وآخرون Huntingtone *et al.*, 2000، راجاجوبالان وآخرون Rajagopalan *et al.*, 1997) (الشكل ١٥,١٣). وبعد ذلك تزال النهاية-N ميثيونين (N-terminal methionine) بالتحليل المائي بواسطة مثيونين أمينوببتيداز (methionine aminopeptidase). ويعد كلاً من ديفورميليز وأمينوببتيداز أساسيان بواسطة تحليل حذف الجين (gene deletion analysis) في الإشريكية القولونية، مما يثير الإحتمال بأن هذين الإنزيمين هدفين صالحين لمضادّات جرثومية (بكتيرية). وديفورميزهو ببتيداز معدني (ميتالوببتيداز metallopeptidase)، يثبط بواسطة ربيطات معدن – مستخلبة (metal-chelating ligands) (أبفيل وآخرون Apfel *et al.*, 2001، تشين وآخرون Chen *et al.*, 2000) مثل هيدروكسامات (hydroxamate) الموجودة في داي بِتيديل هيدروكسامات أكتينونين (dipeptidyl hydroamate

actinonin) الطبيعي (الشكل ١٥,١٤) (ترایاس Trias, 2001) وكثير من النظيرات. وهذه المركبات هي مثبطة للبكتيريا بدلاً من قاتلة (مبيدة) للبكتيريا وتظهر الطفرات في تكرارات عالية، على الرغم من أن هؤلاء يميلون إلى التقليل من ملاءمة الطفرات. ويبقى أن نرى على أي مدى ستكون فعاليّة مثبطات ببتيد فورميلاز.



الشكل (١٥,١٣). عمل ببتيد ديفورميلاز ومثيونين أمينوببتيداز لتشذيب فضالات fMet عند نهاية N من البروتينات البكتيرية.

Actinonin

الشكل (١٥,١٤). المنتج الطبيعي أكتينونين هو مثبط مستخلب – معدني لبِبْتيد ديفورميلاز.

ميوبيروسين (mupirocin) وغيره من مثبطات أمينو أسيل–tRNA سنثيتاز (aminoacyl-tRNA synthetase)

يعدُّ ميوبيروسين المنتج الطبيعي (الشكل ١٥,١٥) الذي يمنع دمج أيزوليوسين (isoleucine) في البروتينات بواسطة عرقلة II-e-tRNA synthetase. ويسوّق بوصفه عاملاً مضاداً جرثومياً موضعياً باكتروبان (Bactroban). وقد تم تحديد التركيب للمعقد ميوبيروسين مع المكورة العنقودية الذهبية Ile-tRNA synthetase (سيلفيان وآخرون Silvian *et al.*, 1999)، مما يصادق على ربطه عند الموقع النشط، منافساً ضد ربط Ile-AMP.

ولقد أجريت برامج الفحص ضد tRNA synthetases الأخرى، لكل من البكتيرية وسويات النواة لأغراض التحكم، ولكن لا يوجد نظيرات متقدمة للتقييم السريري. وهذا ليس لعدم وجود نشاط ضد tRNA synthetases المعزولة. وعلى سبيل المثال نظيرات كربوكسيليك من تيروسين تثبط تيروسيل tRNA سينثيتازات (tyrosyl-tRNA synthetases) مع فعاليّة تبلغ جزءاً من ألف مليون جزيء غرامي (جارفيست وآخرون Jarvest *et al.*, 2001)، ويشمل المنتج الطبيعي SB-219383، ويبلغ التركيز المثبط ٥٠٪ 1nM (كيو وآخرون Qiu *et al.*, 2001)، والبعض ١٢,٠٠٠–أضعاف أقل من K_m 12µM لـ L-Tyr. ولقد تم حل تركيب أشعة – إكس لمعقد المثبط – الإنزيم ليسلط الأضواء على تصميم المثبط الآحق (كيو وآخرون Qiu *et al.*, 2001). ولقد تم تحضير نظيرات إيستر من وسائط أمينو

أسيل-AMP، وتشمل Ill-esters من هيدروكساماتات مع استبدال حلقة الأدينين بواسطة أيزوفانيلين (isovanillin) ليعطي نظير Ile-AMP مع تراكيز مثبطة ٥٠٪ جزيئية غرامية دقيقة (micromolar) قليلة ضد Ile-tRNA synthetase (لي وآخرون Lee *et al.*, 2001) . يثبط جلوتاميل -γ- بوروناتات (glutamy-γ-boronates) Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase بفعاليات جزيئية غرامية دقيقة – منخفضة (ديسيكو وآخرون Decicco *et al.*, 2001). ومع ذلك، فكلا هذين النوعين من المثبطات لم تُظهر أي فعاليّة مضادة للبكتيريا؛ لعدم الإمتصاص إلى داخل الخلايا البكتيرية. ومشكلة إيصال مثل المثبطات الأليفة للماء ما تزال دون حل.

Mupirocin

الشكل (١٥,١٥). ميوبيروسين: مثبط Ile-tRNA synthetase.

تكرار دنا ومثبطات الترميم (الإصلاح)

دنا غيراز: كوينولون الجديد ومثبطات غير الكوينولون (nonquinolone inhibitors)

يعدُّ دنا غيرازالهدف الكلاسيكي لمضادّات كوينولون البكتيرية، كما ذُكر في الفصل الخامس، ويستمر الكوينولون الجديد قيد التطوير (انظر بوش وماسيلاج Bush and Macielag, 2000)، ويشمل ليفوفلوكساسين (levofloxacin) للمكورة العقدية الرئوية المقاومة – للبنسيلّين في الإلتهابات الرئوية المكتسبة من – المجتمع. وقد تمت الموافقة عل تروفافلوكساسين (trovafloxacin) في ١٩٩٨م ولكنه قيد في الاستخدام في ١٩٩٩م؛ بسبب سمية الكبد (liver toxicity).

وتمت الموافقة على ٨-ميثوكسيكوينولونز موكسيفلوكساسين (8-methoxyquinolone moxifloxacin) في ١٩٩٩م، ويهدف إلى تقديم النشاط المعزز ضد المكورات العنقودية لمعالجة الالتهاب الرئوي المكتسب من – المجتمع، التهاب القصبات (bronchitis)، والتهاب الجيوب الأنفية (sinusitis) (بونسون وبرات Bronson and Barrett, 2001 b، كوبون وماسترتون Cubbon and Masterton, 2000). وتحتوي متغيرات كوينولونات على رأس الجسر النيتروجين، منتجاً نظم حلقة ٢-بيريدون (2-pyridon ring systems) التي تحافظ على الفعاليّة ضد بعض من أكثر طفرات غيراز شيوعاً ذات المقاومة للكوينولون (تشو Chu, 1999). ولقد وُجِد أن كلينافلوكساسين (clinafloxacin) وسيتافولكساسين (sitafloxacin) يكونا فعالين ضد كل من طفرات GyrA (الوحدة الفرعية غيراز) وParC (الوحدة الفرعية توبوأيزوميراز IV) (أونوديرا وآخرون Onodera *et al.*, 1999، شميتز وآخرون Schmitz *et al.*, 2000). وهناك أنواع أخرى من الجزيئات التي تقدم المرشدين للربيطات المثبطة لـ دنا غيراز و/ أو المشابه توبوأيزوميراز النوع II، توبوأيزوميرازIV.

المنتجات الطبيعية كومارين (coumarin) (الفصل الرابع عشر) المُصنَّعة بواسطة المتسلسلات-نوفوبيوسين، كلوروبيوسين (chlorobiocin)، والمركب المثنوي كومرميسين (الشكل ١٥،١٦) في الواقع يربط واحد إلى ثلاثة رتب من الحجم الأكثر إحكاماً (K_i= 10^{-7} to 10^{-9} M) إلى غيرازيدلاً من الكوينولونات النموذجي (10^{-6} M)، مع كومرميسين ربما يمتد فوق الوحداتين الفرعيتين GyrB في الرباعي A_2B_2 tetramer ليعطي التثبيط الأقصى فعاليّة.

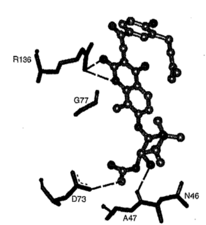
ولقد تم تبلور نوفوبيوسين وكلوروبيوسين معاً مع كسر 24-kDa –N-terminal من الوحدة الفرعية GyrB من الإشريكية القولونية (الشكل ١٥،١٧) التي تتداخل مع موقع حلقة ادينين لـ ATP، متناسقة مع التثبيط التنافسي الملاحظ لربط ATP (انظر هولدجيت وآخرون Holdgate *et al.*, 1997، لويس وآخرون Lewis *et al.*, 1996، تساي وآخرون Tsai *et al.*, 1997).

Novobiocin

Clorobiocin

Coumermycin A1

الشكل (١٥،١٦). مثبطات أمينوكومارين الطبيعية لـــ دنا غيراز.



الشكل (١٥،١٧). ربط نوفوبيوسين مع موقع ATP على الوحدة الفرعية GyrB مع عرض التفاعلات الرئيسة المختارة. (بالإذن من لويس وآخرون Lewis *et al.*,1996).

في حين أن كومارينات كانت ذات قيمة كبيرة في فرز وظائف حقل غيراز، لكنها لم تنجح سريرياً، ربما بسبب مزيج من الذوبان الضئيل، الفعاليّة الضعيفة ضد البكتيريا السالبة - لغرام (الإختراق الضعيف خلال حاجز الغشاء الخارجي) وسمية الفقاريات. وربما تكون مسارات المنتج الطبيعي هذه (الفصل الرابع عشر) قابلة للمعالجات البنائية الحيوية الإندماجية لزيادة التنوع الهيكلي لفصل الأنشطة المضادة البكتيرية المطلوبة من الآثار الجانبية غير المرغوب فيها.

منتج طبيعي آخر، مرة اخرى من المتسلسلات دائمة الإنتاج، التي تُظهر نشاط قوي ضد دنا غيراز النقي في المختبر هو البِبْتيد الخماسي ثياليدين الحلقي غير الريبوسومي (pentapeptide cyclothialidine) (الشكل ١٥,١٨ A). ولقد تم أسر السلاسل الجانبية CH_2OH من Ser و CH_2SH من Cys_4 في رابط إستر ورابط ثيوإيثر، بالترتيب، بواسطة شطر 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxybenzoyl moiety لإيجاد ماكرولاكتون العضو-١٢ الذي يوفر القيد المنظم الفراغي لملء مطابق لمثبط — غيراز من سيكلوثياليدين (الشكل ١٥,١٨ B).

الشكل (١٥,١٨). (A) ببتيد ماكرولاكتون سيكلوثياليدين هو مثبط دنا غيراز، (B) الطريق المفترض لتحليق طليعة البِبْتيد الخماسي غير الرايبوسومي الخيطي.

وما يدعو للإستغراب أن البلور المشارك (cocrystal) من سيكلوثياليدين مع شدفة ر نهاية-N من GyrB كذلك لها تداخل في موقع ATP، يبين ذلك أن كومارينات وديبسي ببتيد الحلقي (cyclic depsipeptide) لها طرق مماثلة لشغل ذلك حيز الربط في حلقة بيورين من ATP (لويس وآخرون Lewis *et al.*, 1996). وسيكلوثياليدين ليس فعالاً ضد البكتيريا السليمة بسبب الإختراق الضعيف، ربما بسبب مكونات البِبْتيد القطبية (polar peptide constituents). وكما وصف في الفصل السادس عشر، فبِبْتيد ثيوإيشر ماكرولاكتون الغيرريبوسومي هذا قد يكون مسارهام لمعالجة البناء الحيوي الاندماجي.

المنتج الطبيعي الثالث الذي يثبط دنا غيراز، مثل أدوية كوينولون، يؤدي إلى التراكم غير العكوس لوسيط دنا-غيراز المضاعف الإنفلاق التساهمي وهو ٤٣- فضالة ببتيد ميكروسين B17 (43-residue peptide microcin B17) (الشكل ٥،٥ C و ١٤،١٤) المنتج بواسطة سلالات مُعيَّنة من الإشريكية القولونية كمضاد ببتيد حيوي. وكما في الفصل الرابع عشر، يرمز ميكروسين B17 ريبوسومياً كطليعة ٦٩- حمض أميني من حيث فضالات ٢٦ للنهاية — إن تفلق بعد ان قد تم تعديل ١٤ من ٤٣ (ستة Gly، أربعة Ser، أربعة Cys) بعد الإنتساخ إلى أربعة أوكسازول وأربعة حلقات ثيازول. ويوجد إثنين (ترادف بيس الحلقات المتغايرة (4,2 tandem bis heterocycles) شيدت في عملية النضوج هذه ويبدو بأن هذه محددات هامة لنشاط المضاد الحيوي (سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999). توجد الإشريكية القولونية المقاومة - لميكروسين مع طفرات عند النهاية —C من GyrB، وجيريز أظهر في الاونة الخيرة بأن يكون هدف القتل (هيديل وآخرون Heddle *et al.*, 2001). وهناك تشابه ميكانيكي لعمل كوينولونات عل غيراز، ولكن يظهر ميكروسين إعتماد مطلق على ATP أو نظير ATP غير القابل للإنفلاق ليحث على تراكم وسيط إنزيم — دنا المنفلق. والتفتيش عن تسلسل ميكروسين B17 يشير إلى وجود لفائف بوليجليسين عشوائية (polyglycin random coil) متخللة بواسطة حلقات متغايرة، من المرجح بأن تكون أشطار ربط دنا وبروتين. ومن غير المعروف ما هو الحد الأدنى لشطر ميكروسين الذي يمنح إهماد غيراز أوما إذا كانت أشطار bis الحلقية المتغايرة الصغيرة ستكون عقاقيرياً وطبياً قابلة للطرق (قابلة للحل).

السم البروتيني البكتيري الصغير، CcdB (11.7 kDa) كذلك يوقع دنا غيرازفي الفخ في معقد مع كسرات خيط دنا —المزدوج. ويُرمِز CcdB (11.7 kDa) و CcdA (7.8kDa)، بروتينه الشريك المضاد للسم (antidote)، في بلازميد F في الإشريكية القولونية. ويرمز بلازميد F برنامج موت الخلية (cell death program) الذي يُشغَل في الخلايا البكتيرية الإبنة التي لم ترث نسخة من بلازميد F أثناء إنقسام الخلية (انظر كوتورير وآخرون Couturier *et al.*, 1998، للمراجعة). وإذا فُقد بلازميد F يُحل CcdA أولاً، بواسطة فعل لون بروتييز (Lon protease)، ومن ثم بإمكان الوحدة الفرعية CcdB التي تم إطلاقها ان تهاجم غيراز وتؤدي إلى موت الخلية. تحليل آلية تثبيط CcdB لجيريز،

مقارنة بكوينولونات، كومارينات، وميكروسين B17، قد يسفر عن تبصرات تصميم جديد إلى مثبطات غيراز جديدة.

وقد أشارت التقدمات التركيبية البيولوجية الحديثة بأن موقع ربط ATP من الوحدة الفرعية GyrB لها نظيرات ثنيات (طيات) مع العائلة الضخمة من البروتينات الرابطة لـ دنا الأخرى المعروفة بعائلة GHL family (من غيراز B، chaperone HsP90، وإنزيم ترميم دنا، MutL (بان ويانج Ban and Yang, 1998)). وقد تم العثور على مجموعة متنوعة من كل من المنتجات الطبيعية والربيطات الإصطناعية (انظر مك ماهون وآخرون McMahon *et al.*, 1998، للمراجعة) التي تعتبر مثبطات قوية وإنتقائية لربط ATP مع البروتينات (وبالتحديد بروتين كينازات)، ومثل هذه المكتبات ربما تكون المصادر للربيطات القوية التي بالإمكان أن تكون المثلى للنوعية والفعاليّة ضد توبوإيزميرازات النوع II البكتير.

البروتينات التي تتفاعل مع رنا

في ديناميكيات أيض رنا، تتشكل معقدات عابرة بين رنا و دنا والبروتينات (انظر تانير وليندير Tanner and Linder, 2001، للمراجعة) ويجب أن يفعل ذلك بنوعية وكفاءة حركية. وتحتاج جزيئات رنا بأن تكون مطوية، غير مطوية، ويعاد طيها في بعض أو كل طولها للوظيفة البيولوجية. الإنزيمات التي تحل (تفك) جزيئات رنا (وربما تعيد لفهم) هي رنا هليكاز RNA helicases (تانير وليندير Tanner and Linder, 2001)، مستعملاً طاقة التحلل المائي لـ NTP لدفع الفك (unwinding)، مثال، رنا المزدوج - الخيط. وتحدد هيليكازات RNA helicases بواسطة سبعة إلى ثمانية تسلسل زخارف (رسوم) محفوظة، وتُظهر تراكيب رنا و هليكازات دنا DNA heicases تشابه ثلاثي - الأبعاد قريب. تحدث بعض وظائف RNA helicase في بدائيات النواة، وتشمل الإنتساخ، النشوء الأحيائي للريبوسوم (ribosome biogenesis)، بدء الترجمة، وتحلل (نكوص) رنا (RNA degradation). وتحدث وظائف أخرى في سويات النواة وتشمل تحرير (تصحيح) Mrna (mRNA editing)، وصل (splicing)، ونقل رنا (RNA transit) إلى السيتوبلازم. وبإلنظر بأن رنا هليكاز RNA helicases هي محركات إنتقال لـ رنا، فلقد تم إعتبارها كإنزيمات رنا شايونز و رنا ماتيوراز و رنا انوايندار RNA chapeones, maturases and unwindases " مشابك مؤقتة " temporary clamps " التي تسمح بإعادة ترتيب تفاعلات RNA بطريقة يمكن السيطرة عليها" (تانير وليندير Tanner and Linder, 2001). وهذه التحليلات أدت إلى الإقتراح بأنه منذ أن كان رنا هليكاز (RNA helicases) مطلوب للوظيفة البكتيرية، فمن الممكن أن تكون أهداف إنزيم المضاد البكتيري مناسبة للتثبيط شريطة تحقيق الإنتقائية مقابل متجانسات سويات النواة.

نظرات جديدة في بعض الأهداف الجديدة

بالإضافة إلى الأهداف التقليدية المصادقة، هناك دلائل على أن العديد من الجوانب الأخرى للأيض البكتيري والفسيولوجيا يجب أن تكون عرضة للمضادّات الحيوية (ألين Allen, 1985، سوتكليف Sutcliffe, 1988). بالإضافة إلى الأهداف التي نشأت والتي سوف تنشأ من نهج الجينوميات التي لوحظت في بداية هذا الفصل، هناك بعض الإنزيمات والعمليات الأخرى التي يوجد لها بالفعل مبررات معقولة إلى قوية للدراسة كأهداف مضادة بكتيرية جديدة .

تصنيع الحمض الدهني البكتيري

يعتبر البناء الحيوي للحمض الدهني ضروري للنمو البكتيري والبقاء على قيد الحياة. ولقد لاحظنا في الفصل الثاني عشر التشابه في المنطق الإنزيمي لخط — التجميع لكل من الأحماض الدهنية ومنتجات بوليكيتيد الطبيعية، في كل من تكوينات (صور) النوع I والنوع II للمحفزات النموذجية أو الوحدات الفرعية المنفصلة، بالترتيب. في سويات النواة، يتم تنظيم إنزيمات fatty acid synthetases (FAS) في الوحدات الفرعية المتعدِّدة النموذجية، كما تم شرحه في لنظم النوع I، في حين أنه في معظم البكتيريا ينظم FASs كنظم النوع II مع وحدات فرعية منفصلة، مما يثير إحتمال التثبيط الإنتقائي. ومن المعروف بأن المنتجات الطبيعية لها عمل مضاد حيوي بواسطة تثبيط البناء الحيوي للحمض الدهني، مثل سيريولينين (cerulenin) (الشكل ١٥،١٩)، الذي يقلول (alkylates) ويثبط نشاط الموقع — النشط سيستين أليف النواة (nucleophilic cysteine) لإنزيم كيتوسينثاز (ketosynthase) في FASs بواسطة فتح حلقة إيبوكسيد (epoxide ring). والمثبط الأكثر إنتقائية لحفَازات كيتوسينثازات البكتيرية يمكن أن تكون فعالة.

ومؤخراً، لقد وجد بأن المطهرات المضادة البكتيرية من صنف ترايكلوسان (الشكل ١٥،٢٠) تعرقل خطوة تشبَع أولفين (olfen) في البناء الحيوي للحمض الدهني المحفَز بواسطة إنزيم enoyl-ACP reductase enzyme FabI في الإشريكية القولونية (مك موري وآخرون McMurry *et al.*, 1998)، مؤكداً أن هذه أهداف جيدة. الطفرات — المقاومة لترايكلوسان في الزائفة الزنجارية لضخ العوامل المطهرة التي تستعمل على نطاق واسع خلال مضخة تدفق MexC-MexD-OprJ (تشوانتشوين وآخرون Chuanchuen *et al.*, 2001). وأُفيد كذلك بأن ١،٤–ديسيوبستيتيوتيد إميدازولات (1,4-disubstituted imidazoles) هي مثبطات لـ FabI ذات حجم مولي (جزء من ألف بليون) دقيق — منخفض (هيردينج وآخرون Heerding *et al.*, 2001). نظيرات المتفطرة السلية لجين enoyl-ACP reductase من الإشريكية القولونية *(fabI in E.coli)* هي *inhA* مع تطابق ٣٦٪. وإنزيم InhA أقل حساسية لترايكلوسان ولكن حساس بالأخص لأيزونيازيد (isoniazid)، أحد المكونات الأساسية للمعالجة الكيميائية االتوليفية للدرن. ويتطلب أيزونيازيد (الشكل ١٥،٢٠ B) تنشيط مؤكسد بواسطة الإنزيم المتفطري كتاليز (KatG catalase) ومن ثم يؤسل NAD المربوط في الموقع النشط لـ InhA ليثبط الإنزيم (روزوارسكي وآخرون Rozwarski *et al.*, 1998). دراسات التركيب —

الوظيفة لكل من FabI و InhA بدأً من ترايكلوسان – والمكتبات المستندة – على أيزونيازيد ربما تؤدي مضادّات حيوية ومطهرات جديدة.

تتطلب الوظيفة في تحفيز FASs لكلا النوع I والنوع II إعداد بعد – الإنتساخ (post-translational priming) لأشكال apo من ACPs بواسطة فوسفوبانتيثينيل ترانسفيرازات (phosphopantheinyl tranferases (PPTases)) ، التي تركّب الحبل فوسفوبانتيثين (phosphopantetheinyl (Ppant) tether) ، المشتق من المادة المشاركة CoASH (لامبالوت وآخرون ١٩٩٦)، في holo ACP (الشكل ١٥,٢١). والآن أشكال holo من ACP تملك مجموعة– SH من مجموعة Ppant الترقيعية، التي تعتبر موقع نمو سلسلة أسيّل. ولقد تم تحديد تراكيب كل من أشكال apo وholo لـ ACPللعصية الرقيقة (إكسو وآخرون Xu *et al.*, 2001)، كما أن للإشريكية القولونية ACP والوحدة الفرعية ACP لأكتينورودين النوع II بوليكيتيد سينثاز (actinorhodin type II polyketide synthase) (كرمب وآخرون Crump *et al.*, 1997).

يستعمل FASs من الخلايا الحيوانية أيضاً Ppant priming of FAS مشابه ، ولذلك فمن غير الواضح إذا كان بالإمكان تحقيق التثبيط النوعي لـ PPTases لبدائيات النواة، ويشمل معقد ACP-PPTase (شيرجادز وآخرون Chirgadze *et al.*, 2000، باريس وآخرون Parris *et al.*, 2000، روتير وآخرون Reuter *et al.*, 1999)، ويسمح بالنهج – المستند على التركيب لتصميم المثبط من أجل إختبار هذه الفرضية. ويعتبر كل من ACPs و PPTases اللذين يعدلاهما أهداف محتملة للمضادّات الحيوية.

O
HO N O
H
Cerulenin

الشكل (١٥,١٩). تركيب المنتج الطبيعي سيريولينين: مثبط النشاط القلوي لسينثازات الحمض الدهني.

A
Cl OH O Cl Cl
Triclosan

B
H O N NH2
N
Isoniazid
+
O NH2
N R
NADH
1. KatG, O2
2. InhA
N O O N---InhA H N R
Acylated NAD in InhA Active Site

الشكل (١٥,٢٠). (A) ترايكلوسان، مطهر مضاد بكتيري، يثبط enoyl-ACP reductase، (B) يتطلب الدواء المضاد للدرن أيزونيازيد الأكسدة الأيضية ليولد NAD المؤسل في الموقع النشط للهدف enoylreductase.

Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase)
OH ACP CoASH 3',5'-ADP
SH O HN O HN O HO O P O O- O ACP

الشكل (١٥,٢١). التفاعل المحفز بواسطة فوسفوبانتيثينيل ترانسفيراز في إعداد حقول **apo ACP**.

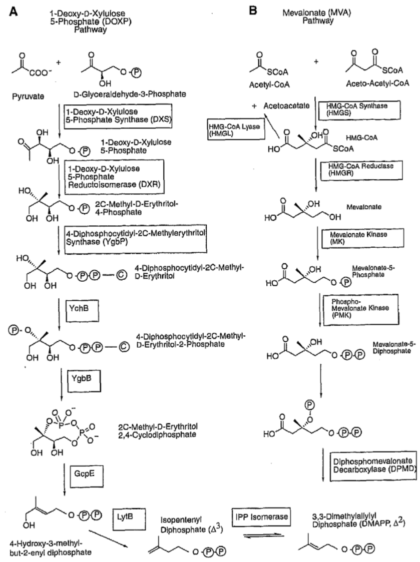
البناء الحيوي لأيزوبرينويد (isoprenoid) البكتيري

إنزيمات المسار غير الكلاسيكي

لخمسين عاماً عرف مسار ميفالونيت (mevalonate pathway) إلى المنتج الطبيعي أيزوبرينويد ودرس جيداً. والجوهر لهذا المسار (الشكل ١٥,٢٢) هو بناء هيكل ميفالونيت ذا سلسلة – متفرعة – ستة – كربون من ثلاثة جزيئات من acetyl-CoA المكثفة تسلسلياً بواسطة إنزيمات ثيوليزوهيدروكسي ميثيل جلوتاريل- CoA سينثاز (thiolase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase). وبعد ذلك يخضع ثيوإستر إلى اختزال أربعة- كربون ليحول ثيوإستر كربونيل (thioester carbonyl) إلى الكحول الأولي لميفالونيت. عملية بيروفوسفوريليشن (pyophosphorylation) عند الكحول الأولي وفوسفوريليشن عند الكحول الثالث (tertiary alcohol) بواسطة اثنين من كينازات (kinases) لإنشاء تفاعل أولفين – المكون لنزع الكربوكسيل / والتخلص من P_i (olfen-forming decarboxylation / P_i elimination reaction) للحصول على أيزومرثومي داي ميثيليل – بيروفوسفات (دايميثيليل -PP allylic isomer dimethyllyl-pyrophosphate (Δ^3) (dimethylallyl-PP). وأخيراً، يُحرك أيزوبينتينيل -PP أيزوميراز (isopentenyl-PP isomerase) الرابط المزدوج إلى مصوغ (أيزومر) Δ^2، أيزوبينتينيل -PP، وبذلك تكون كلا المصاوغات (الأيزومرات) متوفرة لتفاعلات الإطالة (والش Walsh, 1979).

وفي السنوات الأخيرة أصبح واضحاً، بدايةً من دراسات العلامات ومؤخراً من العمل مع الإنزيمات المنقاة (الصافية) (انظر روديش وآخرون Rohdich *et al.*, 2001، للمراجعة)، بأن acetyl-CoA لم يكن المصدر لأي من مصاوغات (أيزومرات) Δ^2 أو Δ^3 أيزوبرينيل -PP، المطلوبة للبناء الحيوي لأيزوبرينويد كوينينات (isoprenoid quinines) البكتيري الأساسي (الإنزيم المشارك Q) وC55undecaprenyl phosphates التي تعمل كحوامل في تجميع الببتيدوغليكان في البكتيريا السالبة – لغرام. وبدلاً من ذلك، فالمسار البكتيري هو غير كلاسيكي (الشكل ١٥,٢٢)، يكثف بيروفيت وجليسيرالديهيد-٣- P (glyceraldehydes-3-P) ليصنع ديوكسيزيلوز-٥- P (deoxyxylulose-5-P(DX-5-P))، وأيضاً كوسيط في البناء الحيوي لثيامين وبيردوكسال (thiamine and pyridoxal). ومن الواضح بأن مثبط الإنزيم الأول DX-5-P synthase هذا سيكون مضاد بكتيري واعد، يُعرقل الخطوة الرئيسة في الأيضات الأساسية الثلاثة. وبعد

ذلك يتحول DX-5-P من السلسلة – المستقيمة إلى هيكل السلسلة – المتشعبة بواسطة ريدكتوأيزوميريز المعتمد على– NADPH (NADPH-dependent reductoisomerase) معطياً الوسيط 2-C-methyl-D-erythritol-4P (ME). وتثبط هذه العملية الإنزيمية بواسطة المنتجة الطبيعي فوسفونيت فوسميدوميسين (phosphonate fosmidomycin) (K_i=10 Nm) (كوبسش وآخرون Koppisch *et al.*, 2002)، ويُفترض بأن يقوم بدور مناظر للوسيط ألديهيد وكنقطة بداية معقولة لتصميم مثبط عملي. والإنزيمان التاليان هما CMP- نيوكليوتيديل ترانسفيراز (CMP-nucleotidyltransferase) ليولّد ME-CDP، وبعد ذلك كيناز، ليطلق CMP وينتج ME cyclic PP. ولقد تم مؤخراً وصف تركيب ME cyclic PP synthase (كيمب وآخرون Kemp *et al.*, 2002).



الشكل (١٥,٢٢). مقارنة (A) المسارات غير الكلاسيكية و(B) الكلاسيكية للبناء الحيوي لأيزوبرينويد في البكتيريا: أهداف جديدة للإنزيم.

والخطوات الإنزيمية التالية لكسر رابط C-OPP (رباط كربون – أكسجين من رابط الكحول -PP) وفقدان كلا المجموعتين -OH ليعطي Δ^2 isopentenyl-PP مازالت غامضة، على الرغم من أنه قد تم اقتراح الآليات (هيشت وآخرون Hecht *et al.*, 2001).

من المرجح أن أي من الإنزيمات المتعدِّدة في مسار غيرمسار ميفالونيت (nonmevalonate pathway) ستكون أهداف مضادة بكتيرية جيدة؛ لأنه مسار ميفالونيت الذي يستعمل في النباتات والحيوانات. ولقد لاحظ هيدل وآخرون (٢٠٠٢) بأن المعلوماتية الحيوية البكتيرية التي توحي بجينات ترمز إلى مسار ميفالونيت هي أساسية في المكورة العنقودية الذهبية وغيرها من المكورات الموجبة – لغرام. على سبيل المثال، وتستعمل المكورة العقدية المعوية البرازية والمكورة العقدية المعوية فيسيم (*Enterococcus faecalis* and *E.faecium*) المسار الكلاسيكي، حيث يدمج الثيوليت وهيدروكسي ميثيل جلوتاريل-CoA ريدكتازات في بروتين واحد، بحيث إن مثبطات المسار الكلاسيكي يجب أنه تعمل ضد هذه المُمْرضات الموجبة – لغرام.

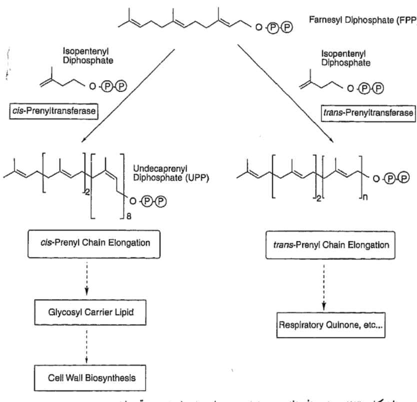
C_{55} أنديكابرينيل -PP سينثاز (C_{55} undecaprenyl-PP synthase)

C_{55} أيزوبرينويد حامل الدهن في مرحلة الغشاء للبناء الحيوي للببتيدوغليكان، أنديكابرينيل-PP، يُجمَع بواسطة *cis* — برينيلترانسفيريز (*cis*-prenyltransferase)، أنديكابرينيل -PP سينثيتاز (فوجيهاشي وآخرون Fujihashi *et al.*, 2001). ويختلف هذا الإنزيم عن *ترانس* – برينيل ترانسفيرازات (*trans* prenyltransferases) التي تطيل C_5 إلى C_{15} وحدات أيزوبرينيل وتحافظ على روابط *ترانس* المزدوجة في صفائف– ١,٥ المميزة لأيزوبرينويدات الطبيعية. وترانسفيرازات التي تطيل أيزوبرينويدات بواسطة الزيادات C_5 لتصنع الروابط المزدوجة لترانس *trans* (E) تزيل الهيدروجين البروتشيري ProR C_5 hydrogen من موحود C_5 allylic، بينما ترانسفيرازات التي تطيل إلى الربطة المزدوجة (Z) *cis* تزيل الـ ProsS C_1-H للموحود Δ^3 allylic monomer. والسلاسل الجانبية C_{30-40} ubiqinone isoprenoid كلها مصاوغات (أيزومرات) E.

يستعمل أنديكابرينيل-PP سينثيتاز بدلاً عن ذلك وحدات فارنيسيل-PP (farnesyl-PP) (C_{15} مع ثلاثة روابط مزدوجة ترانس) كبريمر ويقوم بثمانية إطالات *cis* متتالية مع أيزوبرينيل -PP (الوحدة C_5) كمادة مانحة لتبني سلسلة C_{55} undecaprenyl (الشكل ١٥,٢٣)، مولدة ثمانية وحدات (Z) *cis*-prenyl والوحدات الثلاثة (E) *trans*-prenyl عند النهاية البعيدة لسلسلة C_{55}. ومن غير المعروف كيف أن تركيب أيزومر E_3/Z_8 للروابط المزدوجة يقيد وظيفة الدهن C_{55} كحامل للببتيدوغليكان في بناء جدار الخلية.

ويشارك نفس نوع *cis* – prenytransferase في سويات النواة لينتج السلسلة – الطويلة أيزوبرينويد دوليكول–PP (isoprenoid dolichol-PP) المشتملة في تجميع سلسلة السكريد الأحادي لتسكير البروتين (glycosylation) (بج وبرانديش Bugg and Brandish, 1994). ولذا فإنه من غير المعروف ما إذا يمكن لأحد الحصول على التثبيط الانتقائي

لـ cis- prenyltransferase لبدائيات النواة، ولكن إذا كان من الممكن تحقيقه الذي من شأنه عرقلة تكوين الدهن I والدهن II في البناء الحيوي للببتيدوغليكان. تركيب أشعة - إكس لأنديكابرينيل - PP للمكورة الدقيقة ليوتيس (*Micrococcus luteus*) (فوجيهاشي وآخرون Fujihashi *et al.*, 2001) يشير إلى وجود توجه رابط لقالب / مستقبل فارنيسيل- PP (farnesyl-PP acceptor/ template) ومانح أيزوبينتينيل -PP في الخطوة الأولى (من ثمـانية) لتكوين رابط CC- ويشير إلى السلسلة النامية، مطيلاً خمسة - كربونات في الوقت نفسه، يستطيع أن يملأ الشق (cleft) الراهب للماء. وربما تكون الانشقاقات مستهدفة بواسطة المثبطات.

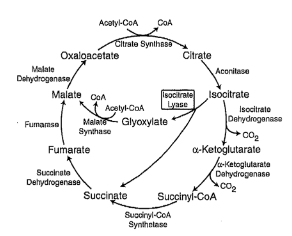


الشكل (١٥,٢٣). إنحرافات مسارات برينيل ترانسفيراز بين تحويلات *cis* و trans-prenyl.

أيزوستريت لياز (Isocitrate lyase)

البديل لأيض الحمض الدهني الذي يبدو أنه هدف جديد في المتفطرة السلية هو تحويل الكربونات من الحماض الدهنية خلال تحويلة جليوكسايليت (glyoxylate shunt) إلى غلوكوز. وعلى الرغم من أن إنزيمات انتقال جلوكسايليت، مثل أيزوستريت لياز (الشكل ١٥,٢٤)، تعدُّ غير أساسية للبقاء للمتفطرة السلية في أطباق التزريع، تعدُّ أساسية للفوعية في الحيوانات (ملك كينني وآخرون McKinney *et al.*, 2000)، مما يدل على أن البكتيريا

الإمراضية تعتمد على الحماض الدهنية للحصول على الطاقة أثناء العداوى في الجسم الحي. وهذا مثال حيث إن فحص الفوعية بدلاً عن فحص المبيد البكتيري يكشف عن هدف جديد محتمل. والدورة جليوكسيليت قد تورطت بالمثل كمتطلب للفوعية الفطرية (لورينز و فينك Lorenz and Fink, 2001).



الشكل (١٥,٢٤). تحويلة جليوكسليت ودور أيزوسترات لياز.

البناء الحيوي للدهن A في البكتيريا السالبة — لغرام

الإستراتيجية التي يمكن أن تستهدف العداوى البكتيرية السالبة - لغرام، ولكم ليس الموجبة - لغرام، هي لعرقلة البناء الحيوي للب الدهن A من مُركَب عديد السكريد الدهني للغشاء الخارجي البكتيري (الشكل A١٥,٢٥). ويسبب لب عديد السكريد الدهني العديد من الآثار الجانبية السامة المصاحبة للعداوى السالبة - لغرام (رايتز Raetz, 1987). ولب الدهن A هو جلوكوسامين ثنائي السكريد (glucosamine disaccharide)، هيكسا-أسيليتيد (hexa-acylated) ويحتوي على فوسفيت إسترات عند ١ و ٤'. وطليعة أشطار غلوكوسامين هي الطلائع الشائعة نيوكليوسيد سكرفوسفو الثنائي (diphosphosugar UDP-GlcNAc) المؤستر (esterified) عند 3-OH مع مجموعة 3-R-3-OH-myristoyl الممنوحة بواسطة 3-R-3-OH-myristoyl-S-ACP المناظرة. وهذا المستقلب بعد ذلك ينوع منه الأسيل على شطر N-acetyl (الشكل ١٥,٢٥ B) بواسطة الإنزيم LpxC قبل ميريستوليشن (N-3-OH-myristoylation (LpxD)). وإنزيم LpxC deacetylase هو إنزيم زنك معدني الذي قد تم تثبيطه بواسطة إنزيم المستخلب المعدني metal-chelating phenyl-oxazolyl hydroxamates (الشكل ١٥,٢٥ C) (جاكمان وآخرون Jackman *et al.*, 1999، أونيشي وآخرون Onishi *et al.*, 1996). وهذه المثبطات لم تحرز تقدماً؛ بسبب الاختراق الضعيف إلى داخل البكتيريا، ولكن تحقق بأن LpxC هو هدف قتل في البكتيريا السالبة - لغرام. كما أن فحص مكتبة مثبط الإنزيم المعدني قد قلب الأدوار الرئيسة التي تستهدف LpxC (كليمينتس وآخرون Clements *et al.*, 2002).

الشكل (١٥,٢٥). (A) تركيب لب الدهن A، (B) نزع أسيتيل UDP-GlcNAc بواسطة LpxC، (C) مثبطات phenyl-oxazolyl hydroxamate لإنزيم الزنك LpxC . M^{+2} هو المعدن المرتبط بالإنزيم المطلوب للتحفيز.

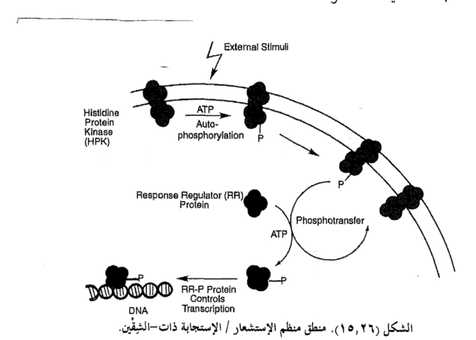
أنظمة الشقيْن التنظيمية

الآليات العامة التي تستخدمها البكتيريا لاستشعار بعض التغيير الكيميائي في بيئتها الدقيقة الخارجية المباشرة في معظم الأحيان تستخدم نظم إشارة التنبيغ ذات – الشقيْن (two-component signal transduction systems)، مع منظمات مجسات واستجابة كعنصرين من البروتين (باريت وهوتش Barret and Hoch, 1998). والمجس عادة هو هيستيدين كيناز (histidine kinase) عبر الغشاء ومنظم الاستجابة هو منشط (مفعل) انتساخي لـ دنا (الشكل ١٥,٢٦) (انظر ماتسوشيتا وجاندا Matsushita and Janda, 2002). استشعار الربيطة عن طريق حلقات (عُرى) حول الجبلَة والحقل المجس عبرالغشاء يؤدي إلى الفسفرة الذاتية (autophosphorylation) للموقع – النشط هيستيدين في حقل هيستيدين كيناز السيتوبلازمي للمجس وما يليه من نقل مجموعة فوسفوريل (phosphoryl group) من P-His إلى Asp-β-carboxylate المحفوظة في النصف الأميني لمنظم الاستجابة. ويحث الشكل P-Asp لمنظم الاستجابة تغيير تجسمي (allosteric change) في تشكَل حقل ربط دنا، ويستطيع المنشط إبطال قمع (derepress) الإنتساخ للجينات المستهدفة (إذا كان قامعاً في حالته القاعدية) ويبدأ الاستجابة المبرمجة.

لقد لاحظنا بأن نظام – الشقين VanS-VanR هو عنصر استشعار/ محول مهم للأنماط الظاهرية VanA وVanB في المكورة المعوية البرازية المقاومة للفانكوميسين (VRE) السريرية المهمة (الفصل العاشر). كما كانت هناك مؤشرات بأن نظم الشقيْن تعدُّ محددات للفوعية البكتيرية. ولقد استعمل النهج القائم – على الجينات لوصف النظم المنظمة ذات – الشقيْن في المكورة العقدية الرئوية (ثروب وآخرون Throup *et al.*, 2000)، الذي تم فيه اكتشاف ١٤ زوج

جينات ذات – الشقْين. وعلى الرغم من أن الوظائف الفسيولوجية للأزواج الـ ١٤ لم يمكن تحديدها بسهولة من التسلسل، فمن الممكن إخراج كل زوج وتقييم إمراضية طفرات المكورة العقدية الرئوية في نموذج (موديل) عدوى الجهاز التنفسي في الفئران. وأحد منظمي الاستجابة، في العائلة الفرعية OmpR، كان أساسياً للنمو، وكان لهذا مناظرات أساسية في المكورة العنقودية الذهبية والعصية الرقيقة. سبعة أزواج جينات أخرى ذات – الشقْين، عندما تتحور (تتطفر)، تُظهر بعض التوهين (attenuation) في نمو المكورة العقدية الرئوية في نموذج عدوى الجهاز التنفسي في الفأر.

في المكورة العنقودية الذهبية، تعطل زوج الشقْين *srhS-srhR* أدى إلى ٣- لوغاريتم التوهين (3-log attenuation) لنمو سلالة المكورة العنقودية الذهبية هذه في نموذج الكلية التهاب الكلية والحُويضة (pyelonephritis model) في الفئران (ثروب وآخرون Throup *et al.*, 2001) وأشار تحليل صفوف Mrna بأن زوج الشقين هذا مهم لقابلية المُمْرض على النمو عند ضغط الأكسجين المنخفض (low oxygen tension) عند التبديل للطرق اللاّهوائية لتوليد الطاقة. والآهوائية الاختيارية (facultative anaerobiosis) للمكورة العنقودية الذهبية هو واحد من السمات الرئيسة التي تتيح له بإنتاج عداوى النسجة – العميقة، المستمرة.



الشكل (١٥,٢٦). منطق منظم الإستشعار / الإستجابة ذات–الشِقّين.

وهذه النتائج مهدت الطريق لتحليل الدور الخاص لأزواج الإستشعار / المُحولة ذات الشِقّين الثمانية هذه في الإمراضية، وتشمل العمليات مثل الالتصاق والتحلل الذاتي (adhesion and autolysis)، وربما تساعد في تحديد الأولوية لأي زوج من الشِقّين يفضل كأهداف مضادة بكتيرية. وكشف تحليل مجين الزائفة الزنجارية ٦٣ أو ٦٤ نظم ذات – شِقّين، مما يوحي إلى إستراتيجيات تحكم متطوّرة ومعقدة لإدماج الإشارات الخارجية بواسطة هذا المُمْرض

المتنوع (رودريجو وآخرون2000 Rodrigue *et al.*,). وقد تم تحديد واحد من هؤلاء من منظمي الاستجابة للزائفة الزنجارية، PvrR كمغير للتحول النمطي الظاهري من أشكال المقاومة - للمضاد الحيوي إلى الحساسة للمضاد الحيوي وكذلك تسهم في تشكيل الفلم الحيوي (biofilm) (درينكارد واوسوبيل Drenkard and Ausubel, 2002).

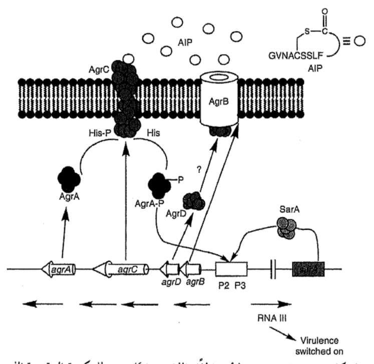
لقد ارتبطت نظم الشقين مع الفوعية. ففي سلالات المكورة العنقودية الذهبية، تعدُّ دائرة الشقيْن *agr* signaling circuit عنصراً أساسياً في التحكم الجيني لإظهار محددات الفوعية، وتشمل إفراز الإنزيمات الخارجية، السميات البروتينية، الاصقات (adhesions) (ليون وآخرون Lyon *et al.*, 2000). وزوج الشقين *agr*، AgrC و AgrA، تحت تحكم نصاب - الاستشعار (انظر اسفل). في المُمْرض السالب- لغرام السالمونيلا إنتيريكا ضرب تيفيميوريم (*Salmonell enteric* serovar Typhimurium) يشغَل زوج الاستشعار/ المحول PhoP-PhoQ بواسطة تقييد (تحديد) Mg^{2+} أو Ca^{2+} بعد ابتلاع البكتيريا بواسطة الخلايا البلعمة الكبيرة (macrophages) أو الخلايا الظهارية. ينشط PhoP-PhoQ جينات الانتساح التي تعيد قولبة (بناء) الغشاء الخارجي، ويشمل التعديلات على الدهن A (جيو وآخرون Guo *et al.*,1998). وتشمل هذه إضافة أمينوأرابينوز (aminoarabinose) إلى مجموعات فوسفيت للدهن A وإضافة مجموعة أسيل سابعة، سلسلة بالميتويل (palmitoyl chain)، إلى الدهن A، الحفَازة بواسطة PagP. ومن ضمن التأثيرات. ومن بين الآثار إحداث التعديلات في شحنة السطح للغشاء الخارجي التي تنتج المقاومة للبِبْتيدات المضادة الجرثومية الكتيونية، وتشمل تلك من الخلايا البلعمية الكبيرة وكذلك من المضاد الحيوي الكتيوني بوليميكسين B (الفصل السادس) (جيو وآخرون Guo *et al.*, 1997). المركبات التي من شأنها عرقلة كل من زوج الاستشعار / المحول Agr في المكورة العنقودية الذهبية أو زوج PhoP-PhoQ في السالمونيلا ضرب تيفيميوريم سوف توعد بعوامل مضادة بكتيرية جديدة، كما هو في مثبطات السلامونيلا PagP أسيل ترانسفيراز.

وصلت سبل الفحص عن KinA بروتين هيستيدين كيناز من العصية الرقيقة إلى عديد من المثبطات، وتشمل كلوسانتيل تتراكلوروساليسيلانيليد (closantel tetrachlorosalicylanilide) وأتريتيل أميدين (atrityl amidine) (RWJ-49815)، ولكن كل هذه ربما تكون تمسخات غير نوعية، مشوشات للتركيب (perturbants)، ومكدسات بروتين بدلاً من موجهات محددة (هيليارد وآخرون Hilliard *et al.*, 1999، ستيفينسون وآخرون Stephenson *et al.*, 2000). وتحليل الصف الدقيق (microarray analysis) قد تم تطبيقه على نظم الشقين للعصية الرقيقة (كوباياشي وآخرون Kobayashi *et al.*, 2001).

وتم تحديد تركيب أشعة - إكس للعديد من منظمات الاستجابة والحقول الحفَّازة لكينازات الاستشعار (روبينسون و ستوك Robisnon and Stock, 1999)، مما أدى إلى إدراجها في العائلة الفرعية GHL للبروتينات الحالة لـATP المذكورة أعلاه لـ DNA غيراز. ومرة أخرى، المجموعة الكبيرة من مثبطات موقع-ATP من بحث بروتين كينازينبغي أن تكون نقاط انطلاق جيدة للكشف عن الموجهات التي ستكون انتقائية للربط مع جيب أدينين (adenine pocket) لمواقع ATP لهستيدين مستشعر كينازات (histidine sensor kinases).

البناء الحيوي استشعار النصاب: التشبيط لتوهين الفوعية

لاحظنا في الفصل الحادي عشر استخدام نظم استشعار النصاب الذي بواسطته تستشعر البكتيريا الكثافة السكانية وتصنع استجابات متواسطة وراثياً لتنتج عناصر الفوعية، وتشمل المضادّات الحيوية. وكما ذُكر أعلاه، أن موضع Agr في المكورة العنقودية الذهبية يعد جزءاً من الاستجابة العالمية للفوعية. وكما هو مبين في الشكل (١٥,٢٧)، بروتينات AgrC و AgrA من مُشغَّل الخمس جينات five-gene *agr* operon هي مجس كيناز عبر الغشاء ومنظم الاستجابة (ليون وآخرون Lyon *et al.*, 2000). يعد Agr B ببتيد مضخة التدفق المكرَسة للمعالجة الإنحلالية للبروتين وإفراز منتج الجين AgrD، شكل قبل (بدء) البِبْتيد (propeptide form) من البِبْتيد المُحث الذاتي الناضج (autoinducing mature peptide) (AIP).



الشكل (١٥,٢٧). موضع البِبْتيد الحفّاز الذاتي، مشغّل agr للمكورة العنقودية الذهبية.

وبمجرد معالجة AIP بالانحلال البروتيني وإفرازه، فالربيطة الخارجية لـ AgrC هي التي تُشغّل المزيد من الانتساخ للموضع Agr في الخلية المنتجة والخلايا المجاورة. يُقدم استشعار – النصاب المعتمد على الكثافة من قبل تركيز AIP المركز، الانتشاري واستقباله المحدد بواسطة AgrC. ويعد تركيب AIP شاذ. وهو ثيولاكتون (thiolactone) من ثمانية إلى تسعة فضالات، تنشأ من أسر فضالة نهاية–سي فينيل الآنين (C-terminal phenylalanine) بواسطة السلسلة الجانبية لـ (Cys_5). الأكتامز الحلقي أو لاكتونز الحلقي المقابل، الذي يستبدل N أو O لـ S من ثيولاكتون،

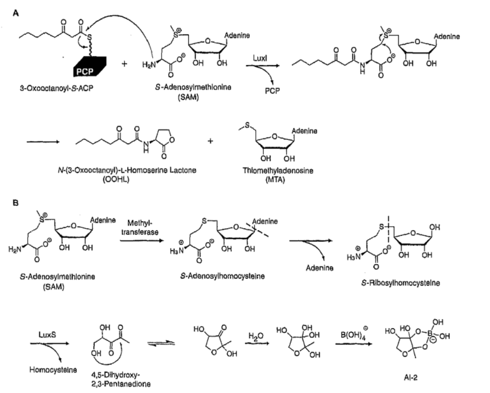
هي مثبطات، ترتبط مع الحقل الخارجي لـ AgrC ولكن لا تحول الإشارة عبرياً (ليون وآخرون Lyon *et al.*, 2000). وهذا يشير إلى نهج لتضاد (استعداء) مسار إشارة Agr، ويولد مثبطات عالية لمسار استجابة الفوعية هذا. ولقد شوهد أربعة متغيرات من AIP، مما أدى إلى تصنيف المجموعات الأربعة من فيرمونات AIP من المكورة العنقودية الذهبية (ملك دويل وآخرون McDowell, *et al.*, 2001). ويبدو كذلك بأن نظم نصاب الاستشعار في البكتيريا الأخرى الموجبة – لغرام تتواسط بواسطة بِبْتيدات صغيرة تعمل على الفيرمونات (للمراجعة، انظر كليريبيزيم وآخرون Kleerebezem *et al.*, 1997). وتشمل هذه تطوير التنافس الوراثي في العصية الرقيقة والمكورة العقدية الرئوية وتنظيم المُشغّلات لإنتاج صنف لانتيبيوتيك من مضادّات الببتيدات الجرثومية (الفصل الرابع عشر).

يبدو كذلك بأن نظم استشعار – النصاب هي محددات مهمة لعلم التشكل (المورفولوجيا) والاتصال عندما تنمو البكتيريا في تكدسات (aggregates) في الأفلام الحيوية، التي تحدث، على سبيل المثال، على القثاطرالمستقرة (indwelling catheters) في المرضى المنومين. وتحت هذه الظروف غالباً ما تكون البكتيريا مقاومة للمضادّات الحيوية؛ بسبب الاختراق الضعيف خلال أغطية عديد السكريد المصطنعة في هذه الأنماط الظاهرية (ميللير وباسلير Miller and Bassler, 2001). والنهج الأكثر مباشرة للتثبيط سيكون لعرقلة البناء الحيوي لمشيرات (ملوحات) النصاب التي تستهل تطوير الفلم الحيوي . وفي سياق Agr المحدد أعلاه، حيث البِبْتيد هو جزيء الإشارة، هذا من شأنه أن يكون إما إنزيم AgrD الذي يصنع شكل قبل البِبْتيد (propeptide form) للبِبْتيد الحفّاز وإما نشاط البروتياز لمضخة تصدير AgrB.

وفي الحالة العامة للكائنات السالبة – لغرام التي فيها لاكتونات أسيل هوموسيرين (acylhomoserine lactones) هي جزيئات نصاب – الاستشعار البين الخلوي، سوف تكون عائلة LuxI synthases هي الهدف. ينتج أسيل هوموسيرين من إس – ادينوسيل ميثيونين ((S-adenosylmethionine (SAM)) والمادة المشاركة acyl-S-ACP (هانزيلكا وآخرون Hanzelka *et al.*, 1999). وعلى الرغم من أن القليل من تفاصيل الآلية معروفة ولكن العائلة الكبرى لإنزيم LuxI يعتقد بانها تعمل أولاً كأميد سينثازات (الشكل ١٥,٢٨) لتولد N-acyl-SAM وACP الحر، يتبعه تحليق كاربوكسيلات أكسيجين (cyclization of the carboxylate oxygen) على بيتا–كربون من شطر (SAM-methionyl)، مع انفلاق الربط C_β-S. وهذه خطوة تكوين لاكتون وتطلق المنتج المشارك ثيوميثيل أدينوسين (thiomethyladenosine). ينبغي أن يكون من الممكن العثور على أو صنع مثبطات نوعية (محددة) وفعالة من الهائلة الكبرى لهذا الإنزيم وعرقلة إنتاج نصاب – الإشارات. ولقد تم مؤخراً حل تركيب شعة – إكس للاكتون سينثيتاز EsaI من الزائفة ستيوارتيي (*Pseudomonas stewartii*) وسوف يكون نقطة انطلاق للتصميم المستند – على التركيب للأدوية (واتسون وآخرون Watson *et al.*, 2002).

لقد تم مؤخراً الكشف عن عائلة ثانية من المستحثات الذاتية للنصاب، AI-2 لتسير على مضي AI-1 لاكتونات هوموسيرين، في البكتيريا السالبة – لغرام وتشمل الإشريكية القولونية النزفية المعوية (enterohemorrhagic

(*E.coli* O157:H7) والفرضية المتقدمة القائلة بأن AI-1 المشاركة في الاتصال بين الأنواع (intraspecies) في حين أن AI-2 هو للاستشعار بين الأنواع. وكل من لاكتونات أسيل هوموسيرين وAI-2 -نصاب الاستشعار مشتقة من SAM . بينما يفلق SAM LuxI إلى مثيوثيوأدينوسين (methiothioadenosine) وتستعمل سلسلة هوموسيرين كجزء من جزيء إشارة AI-1 ، في المسار AI-2 SAM ويحول إلى S-adenosylhomocysteine بواسطة مختلف مثيل ترانسفيرازات. وبعد ذلك يعمل هيكل S-adenosylhomocyteine بواسطة إنزيمين ، Pfs ليطلق أدينين وينتج S-ribosylhomocystein ، يتبعه LuxS الذي ينتج 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). وDPD في شكل معقدات هيدريت الحلقي (cyclic hydrate complexes) (1,2-diol) مع $B(OH)_3$ في الوسط (البيئة) لينتج شكل بوريت إستر الحلقي النشط (active bicyclic borate ester ,AI-2)، الذي يربط نوعياً بالرياضيات الكيميائية (stoichiometrically)، مع هدفه البروتين، LuxP، بروتين حول الجِبلَّة ذواب وذا صلة مع البروتينات المرتبطة بريبوز (ribose) (تشين وآخرون Chen *et al.*, 2002) (الشكل B١٥,٢٨). دور الإشارة هذا يعد وظيفة حيوية جديدة للمستقلب المحتوي على-بورون (boron-containing metabolite). ومعقد AI-2-LuxP هو الربيطة للفسفرة الذاتية مستشعر كيناز LuxQ ذا- الشقين (تشودير وباسلير Schauder and Bassler, 2001 ، تشودير وآخرون Schauder *et al.*, 2001). الإنزيم المحتوي-على الزنك LuxS (ليويس وآخرون Lewis *et al.*, 2001) يمكن أن يكون هدفاً للعوامل التي تخفض الفوعية.



الشكل (١٥,٢٨). (A) آلية التفاعل المفترضة لأسيل هوموسيرين لاكتون سينثازات (AHL). (B) التوليد الإنزيمي لنصاب إشارات AHL.

الأهداف الأخرى لتوهين الفوعية

مجموعة متنوعة من المُمْرضات البكتيرية الناجحة، مثل، يرسينيا *(Yersinia)*، ليستيريا *(Listeria)* والسالمونيلا قد اكتسبت القدرة على تعديل الأنشطة بين الخلايا للمضيفين الفقاريين لفظ (لتبلد) الدمار. ولهذا أهمية خاصة لهذه المُمْرضات، حيث إنها تحث التذوّت (الدمج بالداخل) إلى داخل خلايا المضيف، مثل خلايا البلعمة الكبيرة، وبعد ذلك تعادل (تحييد) (neutralize) آلية قتل خلايا المضيف البلعمية (جرويسمان Groisman, 2001). ولقد لاحظ ستيبينز وجالان (Stebbins and Galan, 2001)، جالان وكولمير (Galan and Collmer, 1999)، وليبي وتشينويند (Lee and Schneewind, 2001، أمثلة على التشابه التركيبي بواسطة البروتينات البكتيرية لنظيرات خلية المضيف التي تتحكم في استجابات خلية المضيف. تُفرز كل من أنواع اليرسينيا والسالمونيلا بروتينات عبر أغشية جدار المضيف عن طريق النوع III لماكينة الإفراز (جالان وكولمير Galan and Collmer, 1999، ليبي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001)، كما ذُكر في الفصل التاسع. ومن بين البروتينات المحقونة هي تيروسين فوسفتازات (tyrosine phosphatases, YopH) من أنواع اليرسينيا، وSptP من أنواع السالمونيلا (جوان وديكسون Guan and Dixon, 1990، ستيبينزوجالان Stebbins and Galan, 2000)، التي تنزع فوسفوريل (dephosphorylate) بروتينات خلايا البلعمة الكبيرة وتشمل التيروسين كيناز FAK (كيناز الإلتصاق البؤري focal adhesion kinase) مما يؤدي إلى شلل هجوم البلعمة على البكتيريا (بيرسوون وآخرون Persoon *et al.*, 1997). وعندما تحقن السالمونيلا بروتين SopE إلى داخل خلايا المضيف، فيقوم بدور تبادل عنصر جوانين نيوكليوتيد ((guanine nucelotide factor (GEF)) لتسريع تبادل GDP بواسطة GTP عند الموقع النشط لـ Rac1 و cdc42 GTPases (انظر جالان وكولمير Galan and Collmer, 1999، ليبي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001، والمراجع فيهم). وبدورها، تقوم هذه بإعادة ترتيب الهيكل الخلوي لأكتين (actin cytoskeleton) وتُعزز امتصاص السامونيلا إلى داخل خلية المضيف، حيث يمكن استعادة الوظيفة الطبيعية للهيكل الخلوي لخلية المضيف عن طريق تسليم البرويتن البكتيري SptP الذي يكون بمثابة GAP (GTPase accelerating protein)، لتعزيز تراكم Rac1 و cdc42 في حالات GDP الأصلية، الهاجعة، غير النشطة. وهذا يحد من إضطراب GTPases المضيف والهيكل الخلوي وماكينة الدمج الداخلي، ويسمح لخلية المضيف المصابة بالبقاء والسالمونيلا بالإختفاء "hide out" في البيئة الدقيقة المفصولة. وأي من بروتينات SopE GEF أو SptP GAP من السالمونيلا سوف تكون أهداف محتملة لخفض الفوعية والإمراضية لمثل إستعمارات السالمونيلا هذه. وكذلك هو شأن العوامل التي تعرقل تجميع أو وظيفة ماكينة الإفراز النوع II عن طريق مكونات كل من الغشاء الداخلي والغشاء الخارجي (الفصل التاسع).

معرقلات التدفق

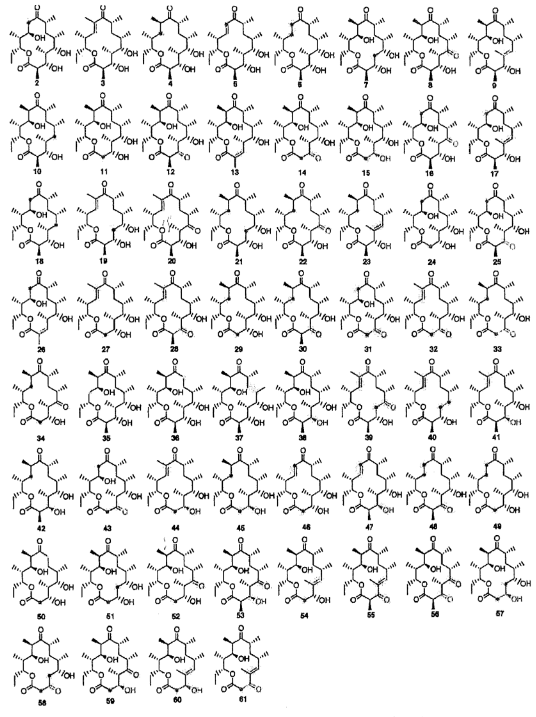
لقد تم إجراء الفحوصات لمعرقلات مضخة التدفق ضد نظم MexA-MexB-OprM، MexC-MexD-OprJ، وMexE-MexF-OprN للزائفة الزنجارية، فضلاً عن مضخات الثلاث – عناصر AcrA-AcrB-TolC للإشريكية القولونية،

في محاولة للحج من تدفق فلوروكوينولون. والمركبات الموجهة ثبطت المضخات ، خفضت كل من المقاومة الداخلية والمقاومة المكتسبة ، وخفضت تواتر ظهور الطفرات المقاومة – لغيراز (لوموفسكايا وآخرون Lomovskaya *et al.*, 2001).

المنتج النباتي الطبيعي ٥ –ميثوكسيهيدنوكاربين– د (5'-methoxyhydnocarpin D) (الشكل ١٥,٢٩) هو واحد من معرقلي المضخة النشط لتدفق فلوروكوينولون (ستيرميتز وآخرون Stermitz *et al.*, 2000)، مما يشير بأن هيكل – عمل النشاط سوف يكون ممكناً. وبالمثل ، فتعديل تراكيب تتراسيكلين قد أنتج مشتقات كلوروبروفيلثيو (chloroprophylthio derivatives) التي تعرقل تدفق بروتينات التدفق Tet (شوبرا وروبرتز Chopra and Roberts, 2001). وكما ذكر في الفصل الرابع ، كذلك تُعد غليسيكلينات (glycylclines) الجديدة (الشكل ٤,٥) معرقلات مضخة تدفق Tet إضافة إلى أنها تكون نشطة في السلالات مع عوامل الحماية الريبوسومية TetM وTetO (ليبي وهيكرLee and Hecker,1999 ، ميتسشير وآخرون Mitscher *et al.*, 1999). كان قد ألمح للمقاومة الداخلية للزائفة الزنجارية للمضادّات الحيوية في الفصل التاسع ، مما يعكس كلاً من الحواجز لدخول المضاد الحيوي بواسطة المسامات وتدفق المضاد الحيوى بواسطة أنظمة المضخة المذكورة أعلاه. تسلسل مجين الزائفة الزنجارية (ستوفر وآخرون Stover *et al.*, 2000) مهد المرحلة للسبل المستندة – على المجينات. وللوهلة الأولى ، فقدرة البكتيريا لترميز بروتينات الغشاء الخارجي (١٥٠ جين) تبدو كبيرة بشكل غير متناسب ، مع ١٩ جين من عائلة مسام OprD ، ٣٤ عضو من عائلة مسام بوابات TonB ، و١٨ جين من عائلة مضخة التدفق OprM. وهذا يشير إلى الطرق المتعدِّدة للزائفة الزنجارية لتحقيق التوازن وتنظيم تدفق الجزيئات عبر الغشاء الخارجي كلاً للداخل والخارج. ويمكن أن تحدد سبل الطرد للخارج المجموعة الفرعية الأساسية في كل فئة ، وتسمح بمقايسات التصميم المستهدفة ضد هذه المجموعات الفرعية لكل من امتصاص المضاد الحيوي ، مثال ، ليعطي "الجيل الخامس" من الكيفالوسبورينات ، ولمعرقلات تدفق المضاد الحيوي.

5'-Methoxyhydnocarpin D — Naphthyl Dipeptide

الشكل (١٥,٢٩). معرقلات مضخات التدفق المبلّغ عنها.



مكتبة من متغيرات إريثرونوليد ماكروليد (erythronolide macrolide) عن طريق إعادة برمجة حقول DEBS synthase (بالإذن من ملك دانييل وآخرون McDaniel *et al.*, 1999).

الفصل السادس عشر

الجزيئات الجديدة
NEW MOLECULES

مع الأهداف الجديدة التي سيتم تحديدها والمصادقة عليها من قبل المجينات البكتيرية، مجموعات الفحوصات التي تسمح بالإنتاجية العالية والتشغيل الآلي، والتعقيد المتزايد لتحليل أصناف منتجات الجين مثل تلك التي تعتبر ضرورية للفوعية والبقاء في الحيوان ولكن ليس للنمو على أطباق التزريع، هناك أدلة على أن درازن (عشرات) إلى مئات الأهداف الجديدة، والعديد من غير المعروف وظيفتها حالياً، سوف تكون متاحة في المستقبل القريب. الفحوصات الآلية العالية الإنتاجية لها القدرة على فحص ما يصل إلى ١٠٠,٠٠٠ مركب في الأسبوع، وهذا جرد نموذجي لملايين المركبات التي يمكن تشغيلها في أقل من ثلاثة أشهر.

الموارد المحدودة لاكتشاف دواء مضاد جرثومي والتطوُّر في هذا السياق ربما تكون المصادر لجزيئات جديدة التي تخدم كضربات أولية كربيطات و/أو مثبطات أهداف بروتين جديدة أو تسلسلات رنا. تاريخياً، لقد كانت المنتجات الطبيعية مصدراً غنياً للمركبات الحيوية النشطة، وبالأخص المضادّات الحيوية، وربما تبقى نقطة الانطلاق، على الرغم من وجود سؤال عما إذا كانت الأصناف الجديدة القيمة من المنتجات الطبيعية، مثل، المضادّات الحيوية الجديدة، لا تزال غير مكتشفة بعد ٥٠ عاماً من جهود عزل المنتج الطبيعي الحصرية . النهج الثاني المهم على مدى العقد الماضي قد كان لصنع مكتبات من المركبات الاصطناعية. وسوف نقوم بتناول موضوع مكتبات المركبات الاصطناعية، ومن ثم نتحول إلى النُهج الجديدة مع المنتجات الطبيعية كمُرشحات للمضادّات الحيوية.

المكتبات الكيميائية والنهج الكيميائي الوراثي

لقد لاحظنا في الفصول السابقة بأن المركبات الاصطناعية كانت مصدر لثلاثة أصناف من المضادّات الحيوية في الاستخدام العلاجي المعاصر: أدوية السلفا، الكوينولونات، و أوكسازوليدينونات. وهناك ما يدعو إلى الاعتقاد بأن الجزيئات الجديدة يمكن أن تصنع لتكون مفيدة ضد أهداف جديدة، التي يكون فيها احتمال المقاومة المستندة

على – الجين السابقة الوجود منخفضة، وبالأخص إذا كانت التراكيب الاصطناعية الجديدة لم تشاهد في الطبيعة. وعلى سبيل المثال، تثبيط الصنف B – لكتامازات – المعدنية بواسطة بايفينيل تترازولات (biphenyltetrazoles) تناسب هذا النموذج .

وأحد النهج لاكتشاف وتطوير المركب الاصطناعي هو باستعمال المعرفة الآلية والهيكلية، مثال، من برامج التراكيب المجينية، لبناء الهندسة المعمارية التي صممت لترسو فوق موضع الربط المتوقع أو المعروف على البروتين المستهدف. والبديل هو اتباع هذه الإستراتيجية في شكل مكتبة، التي تصنع فيها مئات من الجزيئات في مكتبة مُركَّزة. وعلى سبيل المثال، لقد اتبع هذا النهج مع مكتبات حلقية غير متجانسة (انظر تشانج وآخرون Chang *et al.*, 1999) التي تهدف إلى الربط مع مواقع أدينين ATP- التي تستخدم الإنزيمات (ATP-utilizing enzymes)، ولاسيما ضد بروتين كينازات، ولكن قابلة للانتساخ إلى أي إنزيم حال لـ ATP مثل دنا غيرازأو Hsp90 البكتيري (الذي شُرح في الفصلين السادس والخامس عشر).

الهدف الأكثر طموحاً هو أن نفترض بأن الصيادلة يمكن أن ينتجوا ما يكفي من المجموعة المعمارية والوظيفية المتنوعة في المكتبات الكبيرة من المركبات الاصطناعية حيث هناك أرجحية معقولة بأن لإيجاد ربيطة لأي بروتين. وإذا كان من الممكن بأن تكون هذه الربيطة الأمثل للخصوصية والفعاليّة بحيث إن واحدة من الممكن أن تقترب من الحد الذي فيه بروتين واحد فقط يمكن أن يثبط في السياق الخلوي، ومن ثم واحدة ستكون قد وصلت إلى إدراك علم الوراثة الكيميائية (chemical genetics). ولقد استخدم تشريبر (Schreiber) المصطلح علم الوراثة الكيميائية لوصف هذا السياق، حيث إن المثبط الكيميائي سيكون له النوعية والقوة لتقييم النظام البيولوجي المعقد لتقييم وظيفة البروتين المستهدف مع القوة المعادلة للطرد الجيني الكلاسيكي للجين المُرمِز. وقد لاحظ تشريبر (Schreiber) لك بأن هذا النوع من الأهداف يقلب مفاهيم الكيمياء الاصطناعية رأساً على عقب ويعيد التركيز من التصنيع المنحى- بالهدف، حيث يتم صنع منتج اصطناعي محدد في سلسلة من الخطوات مصممة للتحكم في المنتج بالتجسمية- والموضعية الكيميائية، على الاصطناع-المنحى المتنوع، حيث أهداف المخطط الاصطناعي هي إنتاج أكبر عدد ممكن من المركبات مع أقصى حد من التنوع.

تمثل الكيمياء الاتحادية هذا النهج وقد أحدثت ثورة في الممارسات في الكيمياء الطبية، وتشمل كيمياء المضاد الحيوي الاصطناعي مع إنتاجية-عالية موازية أو تكنولوجيات "الخلط والتقسيم" (mix and split) لإحداث زيادة هائلة في عدد المركبات العضوية التي يمكن الوصول إليها في فترات زمنية قصيرة .ونوعية المكتبات الكيميائية الاتحادية تعتمد على العديد من الخواص، تشمل إعداد الجزيئات، النقاء والتنوع. والمعلمات الرئيسة بالنسبة لتطبيقات الكيمياء الطبية هي للتوصل إلى منتج بنفس تعقيد – الطبيعي في مكتبة الجزيئات. ويشمل ذلك كل من التحكم في الهندسة المعمارية، الأبعاد الثلاثة، وكثافة المجموعات الوظيفية وبالأخص تلك التي تشبه ربيطات لتفاعلات

أهداف المنتج الطبيعي للبروتين والحمض النووي. في بعض السياقات ربما يرغب أحدهم في صلابة محكمة، تراكيب ثلاثية الأبعاد، بينما لعرقلة تفاعلات البروتين – البروتين أحدهم ربما يرغب في جزيئات مسطحة مع وظائف موزعة. وفي جميع الحالات كلما كان العدد أكبر في عدد الجزيئات المتنوعة في المكتبة كلما كانت احتمالية الضربة الموجبة التي سوف يحصل عليها في أي مقايسة.

تلخص الاستعراضات المؤخرة بواسطة أريا وآخرون (Arya *et al.*, 2001, 2001) بعض النهج المستخدمة لبناء مكتبات متنوعة حول قوالب مختلفة التي تثبت العمارة. وعلى سبيل المثال، أنتجت مجموعة تشيربير قالب التتراسيكلين لتصنيع المكتبة، بدأً من المنتج الطبيعي حمض شيكميك (shikimic acid) وانتهاءً بمكتبة تقدر بحوالي مليوني عضو (تان وآخرون Tan *et al.*, 1998، تان وآخرون Tan *et al.*, 1999) (الشكل ١٦,١ A). والنهج الثاني، أيضاً من مجموعة تشربير (ليي وآخرون Lee *et al.*, 1999)، استعمل إستراتيجيات غلق – حلقة الاستبدال والإحلال (ring-closing metathesis strategies) لإيجاد قوالب حلقية كبيرة (macrocyclic templates) مع تعقيد وتنوع محكم (الشكل ١٦,١ B). وفي كل من هذه النهج، قدمت مجموعة وظيفية عالية التنوع في هياكل العمارات والتعقيدات المتميزة . وهذه نذر لأنواع النهج التي من المحتمل أن تولد منتجات بخواص – تشبه الطبيعية في المكتبات الاتحادية الاصطناعية. وبإمكان هذه النهج أن يستخدم التفاعلات المحاكية الحيوية للحصول على منتجات نهائية تقريبية التي تشبه المنتجات الطبيعية ولكن بتنوع كبير في المستبدلات التي لا توجد في الطبيعة. وعلى سبيل المثال، شاير وزملاؤه (Shair and colleagues) (ليندسلي وآخرون Lindsley *et al.*, 2000) وصفوا نهج لسقالات (هياكل) بينزوذانثينون (benzoxanthenone) مثل تلك التي توجد في المنتج الطبيعي كاربانون (carpanone)، ولقد جمَع نيكولو وآخرون (Nicolaou *et al.*, 2000a, 2000b, 2000c) المكتبات الاتحادية للمنتجات التي تشبع – الطبيعية المشتقة من بينزوبيرانات (benzopyrans).

قوائم المكتبات التي بنيت من السقالات الخاصة، مثال، تلك المعروفة بأنها تثبط بروتيازات، كينازات، فوسفتازات، وغيرها من الإنزيمات متوفرة (مثال، دوللي Dolle, 2000)، وبالإمكان اختبار هؤلاء ضد الأمثلة البكتيرية الجديدة. وقد لاحظ دوللي (Dolle) كذلك مكتبات ذات أهمية خاصة للجهود المضادة البكتيرية، وتشمل بعض التي صُممت ضد إرم ر– رنا ميثيل ترانسفيراز Erm rRNA methyltransferases (الفصل العاشر) وضد المضخات المتعدِّدة المقاومة للدواء (الفصل التاسع). ولقد لخص هال وآخرون (Hall *et al.*,2001) الأدبيات عن المكتبات الكيميائية التي بنيت مؤخراً لتحاكي قوالب وهياكل (سقالات) المنتج الطبيعي، وتشمل سيكلوسيرين (cycloserine)، تشالكونات (chalcones)، إيبوثيولون (epothiolone)، وفانكوميسين. جميع المؤشرات تدل على أن مكتبات الكيمياء الاتحادية المركزة ستظل مستعدة. ولقد وصف ترياس (Trias,2001) نهج الكيمياء الاتحادية لتعظيم الاستفادة من النشاط في مرشحات المضاد الحيوي الممتد – المدى أوكساسوليدينون، وكذلك لتحويل فحص المركبات المكتشفة إلى الموجهة لتثبيط ببتيد ديفورميلاز (peptide deformylase) (الفصل الخامس عشر).

ولقد لاحظ ويس وآخرون (Wess *et al.*, 2001) بأن أجيال الموجهات هي فقط نقطة بداية للكيمياء الطبية وحددت عديد من المهام والاختناقات في جهود الكيمياء الطبية في تطوير الدواء التي يمكن تطبيقها لتطوير عوامل مضادة جرثومية جديدة. وعليه، فاكتشاف أهداف جديدة ومركبات مكتشفة للفحص الأولي ضد هذه الأهداف، التي وصفت في هذا الفصل والفصل السابق، بحد ذاتها لن ينتج عنها أدوية جديدة أو تقصير الوقت للموافقة ما لم يؤدي التحسين الأمثل ودورات التطوير القبل السريري والسريري أن يكون كذلك عاجلاً في الوقت والكفاءة.

الشكل (١٦,١). أمثلة على النهج نحو المكتبات المقولبة (A) المكتبات الرباعية االدورية المقولبة، (B) المكتبات الدورية الكبيرة المقولبة. (بالإذن من أريا وآخرون Arya *et al.*,2001).

مكتبات المنتجات الطبيعية عن طريق إستراتيجيات البناء الحيوي الاندماجية

توافر تسلسلات الجينات للعديد من المكروبات التي تنتج منتجات طبيعية بدأت تسمح بالتنبؤ واختبار الجينات التي ترمز إنزيمات المسارات الأيضية للمنتج الطبيعي الثانوي، وبالأخص تلك التي تفيد المعالجة. في الفصلين الثاني عشر والثالث عشر رسمنا الخطوط العريضة للمبادئ العامة لخطوط تجميع البناء الحيوي لبوليكيتيدز (PKs) والببْتيدات غير الريبوسومية (NRPs)، وهذه هي حيث البناء الحيوي الاتحادي قد مورس على نطاق واسع بالفعل في الطبيعة. وسوف نلخص فيما يلي بعض الجهود التي بذلت لإعادة برمجة خطوط التجميع هذه ولتفاعلات الحياكة الإنزيمية لما -بعد خط- التجميع لإيجاد متغيرات جديدة للمنتجات الطبيعية "المنتجات الطبيعية غير طبيعية"

"unnatural natural products". إجراء إعادة البرمجة الاتحادية على نطاق واسع سوف يتطلب أعداداً كبيرة من كتل جين (PKS) polyketide synthase و(NRPS) peptide synthetase غير اليربوسومي، وفهم القواعد للقص واللصق لتحقيق أقصى قدر من الوحدات المنطوية ذاتياً، والطرق السريعة لخلط الجين. ويجري إحراز تقدم في كل من هذه الجبهات الثلاث. وأفاد ستروهل (Strohl., 2001) بأن ١١٥ كتل جينات للبناء الحيوي للمنتج الطبيعي معروفة، وبحوالي النصف تمثل كتل النوع I والنوع PKS II. ومن الكتل الـ ١١٥، ٧٠ كانوا من المتسلسلات. وقد بذلت الجهود لإيجاد تسلسلات مسبار أحادي النيوكليوتيد (oligonucleotide probe sequences) الذي له استفادة عالية لانتساخ كل من كتل جين PKS البكتيري والفطري (نيكولسون وآخرون Nicholson *et al.*, 2001) لزيادة عدد كتل البداية. فقد قُدر ما بين ١٪ من المكروبات في التربة والبيئات المائية ربما تكون قابلة للتزريع في المختبر. ولتجنب فقدان ٩٩٪ من التنوع المكروبي لجينات البناء الجيوي للمضادّات الحيوية، فانتساخ ٥٠- إلى ١٥٠ kb- مدرج من عينات الكائن غير القابل للتزريع قد أحرز تقدماً. تقنيات خلط- دنا (DNA-shffling techniques) لتسريع النشوء الاندماجي بين الكتل قد تم تخفيضها للممارسة، على سبيل المثال، بواسطة الفريق العلمي عند ماكسيجين (Maxygen) (زانج وآخرون Zhang *et al.*, 2002).

البناء الحيوي الاندماجي في البوليكيتيدات

مع توفر كتلة البناء الحيوي لإريثروميسين خلال العقد الماضي، هذا النظام كان العمود الفقري لتطوير وتكرير إعادة البرمجة الجينية للماكينة الإنزيمية، مع التركيز الأولي على خط تجميع الوحدات الفرعية الثلاث ديوكسيإريثرونوليد بي سينثاز ((deoxyerythronolide B synthase (DEBS)) (الشكل ١٢،١٦) لإنتاج العضو-١٤ ماكروليد 6-DEB. الطفرات في كل وحدة حفّازة تقريباً (ketosynthase (KS), acyltransferase, ketoreductase, dehydratase, enoylreductase) من الوحدات الفرعية DEBS1,2 و٣ قد تمت هندستها وتحليل تشكيلات المنتج المتغير. (الشكل ١٦،٢) يلخص التغييرات التي نفذت عند المواضع ٢-١٣ من هيكل ماكرولاكتون لـ 6-DEB (كاتز Katz, 1997 : ستروهل Strohl, 2001).

بالإمكان التحكم في حالة الأكسدة لأي بيتا-كربون (*β*-carbon) في أي من دورات الاستطالة، كما يمكن استخدام مالونيل أو ميثيل مالونيل عند أي موقع إمتداد (extender site). ووحدة التحميل قد تم تجاوزها خلال الطفرة لإبطال نشاط حقل KS في حقل التحميل والمغذية الخارجية أسيل داي كيتيد ثيوإسترز (acyl diketide thioesters). ويمكن للمرء أيضاً دمج حقول تحميل مختلفة لتغيير وحدات البداية التي تم إدراجها.

لجعل البداية نحو إعادة البرمجة الاندماجية (الاتحادية)، فقد استعملت مجموعة كوسان للعلوم البيولوجية (Kosan Biosciences) نظام-الثلاث بلازميدات (three-plasmid system) لخلط طفرة واحدة فوق كل من وحدات DEBS الفرعية الثلاث وأفادت عن مكتبة من بعض ٥٠ متغيراً ماكرولاكتون (ملك دانييل وآخرون McDaniel *et al.*, 1999).

الشكل (١٦,٢). التغييرات التي تمت هندستها في هيكل 6-DEB macrolide. (بالإذن من ستروهل Strohl, 2001).

في حين أن حجم حلقة إريثرونوليد الطبيعي هو ١٤ ذرة، فخط - تجميع تيلوسين لديه وحدة إضافية وينتج ١٦- العضو لاكتون. وقدتم الكشف عن إصدارات العضو — الستة عشرة من هيكل إريثرونوليد في الطفرة المتأتأة (tuttering mutant) من سكارابوليسبورا إريثري *(Saccharapolyspora erythrae)* (ويلكينسون وآخرون Wilkinson *et al.*, 2000) وكذلك بواسطة تغذية كيتيد الثلاثي (ترايكيتيد) (triketide) في مكان دايكيتيد (كيتيد الثنائي) (diketide) إلى وحدة التحميل المعطلة لخط تجميع DEBS (الشكل ١٦,٣) (كينوشيتا وآخرون Kinoshita *et al.*, 2001)، مما يشير إلى تحقيق حجم الحلقة الكبيرة (macro ring size) المتغير عن طريق تحليق حقل ثيوإستر عند نهاية-C للوحدة الفرعية DEBS3 . وبينما نفذت التقنيات بشكل مكثف فقط في نظام DEBS حتى الآن، هناك سبب يدعو إلى الاعتقاد بأن هذه النهج سوف تكون عمومية لإعادة هندسة خطوط تجميع PKS الأخرى، في نماذج اندماجية.

تشمل تفاعلات الحياكة الآحقة على الإريثرونوليد ماكرولاكتون إثنين سيتوكروم النوع- P450 هيدروكسيلازات (P450-type hydroxylases,EryF and EryK) لإدخال هيدروكسيلز عند C_6 و C_{12} و bis glycosylation عند C_3 (مع TDP-L-mycarose) وC_5 (مع TDP-D-desosamine) (انظر الشكل ١٢,١٩). وعديد من سيتوكروم P450 hydroxylases باقية، وربما أن البعض سوف يُضيف عنصر الهيدروجين (hydroxylate) للعضو-١٤ لاكتون مع التغيير الموضعي النوعي. الاحتمالات الاندماجية لارتباط بالغليكوزيل يمكن أن تعمل على مستويين: البناء الحيوي للسكر منزوع الأكسجين TDP-deoxysugar ومن ثم عمل الغليكوزيل ترانسفيرازات (Gtfs). والمسارات من النيوكليوتيد سكر داي فوسفو TDP-glucose إلى TDP-D-desosamine وإلى TDP-L-mycarose معروفة وحددت الإنزيمات المفردة التي تعمل على نزع الأكسجين (deoxygenations) الصافي عند C_6,C_4 و C_2 كما هي التي تقسم (epimerizing) C_5 وتؤيمن اختزالياً (reductively aminating) C_3 (انظر الشكل ١٢,٢٠).

Normal DEBS Assembly Line

DEBS$_1$ Knockout Assembly Line

Triketide-SR

(R = H or Me)

الشكل (١٦,٣). الطرق لحجم حلقة ماكرولاكتون المتغيرة في خط تجميع DEBS.

من المحتمل طرد واحد أو أكثر من هذه الجينات واستبدالها بإنزيمات أخرى ومعالجة مسارات TDP-deoxyhexose في المختبر وفي الجسم الحي. وعلى سبيل المثال، في المتسلسلة فينزويلي في مسارات البناء الحيوي لبيكروميسين (pikromycin)، ٣-كيتو ماكروليد المفتقر لمستبدل 3-α-mycarosyl (الشكل A١٦,٤) (انظر إكسو وشيرمان Xue and Sherman, 2001، للمراجعة)، توجد جينات البناء الحيوي لديسوسامين في كتلة PKS.

ولإثبات بأن مسار TDP-desosamine يمكن إعادة برمجته، طرد جين *des I وإستبدل* بجين *calH* من مسار البناء الحيوي كالكياميسين (calicheamycin) (الشكل B١٦,٤) .وهذا تم تمييزه بواسطة إنزيمات المصب، مجموعة أمينو -N acetylated الجديدة (للحماية – الذاتية ؟)، والسكر الجديد المنقول إما إلى C_3 من ماكروليد الحلقة-١٢ أو إلى C_5 من 3-keto-14-membered macrolide لينتج مضادين حيويين جديدين (زهاو وآخرون Zhao *et al.*, 1999). وإذا حذف CalH، بعدها يثبت سكر د-كوينوفوس (D-quinovose sugar) عند C_5 (بوريسوفا وآخرون Borisova *et al.*, 1999). وهذه النتائج تمهد الطريق للمعالجة الاندماجية لتراكيب وسيط TDP-deoxysugar. كما أنها أشارت إلى أن DesVII، بيكروميسين غليكوزيل ترانسفيراز (pikromycin glycosyltransferase)، يظهر ما يكفي من الاختلاط الذي سينقل مناظرات سكر ديوكسي من الركائز الطبيعية TDP-hexose. ولقد قام ملك دانييل وزملاؤه (تانج وملك دانييل Tang, and McDaniel, 2001، رودريجوز وملك دانييل Rodriguez and McDaniel, 2001) بإعادة بناء مسار البناء الحيوي لـ DTP-desosamine في المضيف غيرا لمتجانس وثبت أن عديداً من المركبات في المكتبة والمبينة في الشكل (١٦,١٢) يمكن بذلك أن تكوّن غليكوزيليتيد لتكتسب نشاط المضاد الحيوي. وكثير من Gtfs من كتل PKS يمكن انتساخها واختبارها للتشويش والتساهل تجاه كل من تراكيب أجليكون ماكروليد، كالمكتبة في الشكل (١٦,٣)، وتجاه المتغير TDP-deoxyhexoses و- aminohexoses.

وباختصار يمكن لأحد في الوقت الحاضر تغيير حجم حلقة ماكروليد، الوحدات المبتدئة لماكروليد، الهوية المستبدلة وحالة الأكسدة تقريباً في كل موقع كربون على الماكروليد، هوية ديوكسي-أمينوهيكسوس، وموضع

ارتباط بالغليكوزيل. ومن قبيل هذه الإستراتيجيات الاندماجية من الواجب أن تكون مُتاحة في وقت ما لتوليد مكتبات البناء الحيوي من بضع عشرة من الآلآف من ماكروليدات الجديدة.

الشكل (٤، ١٦). المعالجة لمسارات TDP-deoxyhexoses في المتسلسلة فيتزويلي، (A) الافتقار إلى شطر ديسوسامين عندما يبقى الموضع–٣ ككيتون في بيكروميسين، (B) استبدال *desI* بواسطة *calH* لتغيير السكريات على هيكل ماكروليد.

أحد القيود العملية هو الطول الخطي لخطو – تجميع PKS الكبيرة. وحصل أن وُزعت على وحدات فرعية متعدِّدة (مثال، DEBS1,2, and 3). ومن ثم يتوجب على الوحدات الفرعية العثور على بعضها بعضاً والتوجيه للنقل الموجه للسلسلة النامية اتجاهياً بين الوحدات الفرعية. وهذا يمكن أن يكون ذا قيمة في إعادة البرمجة الاندماجية، شريطة أن أحد بإمكانه حل المنطق الذي بواسطته أن تجد الوحدات الفرعية بعضها بعضاً وتصطف. خوسلا وزملاؤه Khosla and colleagues (جوخلي وآخرون Gokhale *et al.*, 1999) قد صنعوا البداية بواسطة اكتشاف وجود المناطق الرابطة للنهاية -C والنهاية -N في الوحدات الفرعية DEBS وإظهار قابليتها للتنقل. وفي حالة تعميم هذه الإستراتيجية، سيكون بالإمكان تشييد مكتبات لوحدات PKS مع روابط مناسبة لتوجيه تفاعل الوحدة–الوحدة وزيادة احتمالية نقل السلسلة الكفؤ والنمو عبر الواجهات للوحدة والوحدة الفرعية في مكتبات الوحدات التي تمت هندستها.

البناء الحيوي الاندماجي في NRPs وفي هجينات NRP-PK

توجد كتل جين NRPS في كل من البكتيريا والفطريات. ولقد تم وصف عشرات التسلسلات ومئات الكتل يرجَح أن تكون متسلسلة في المستقبل القريب، منتجة قوائم الأجزاء لتبادل الوحدات ولاختبار نهج البناء الحيوي الاندماجية لمضادّات الببْتيد الحيوية الجديدة. واحدة من السمات الجذابة لمنتجات الببْتيد الطبيعية NRPS هي التنوع الكبير في موحودات الحمض الأميني (وحمض هيدروكسي) التي دُمجت، <100، مقارنة مع الحد ٢٠ للأحماض الأمينية المولدة للبروتين (proteinogenic) في الببتيدات الريبوسومية.

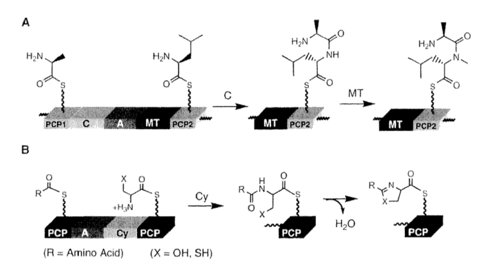
تم العثور على الجينات البنائية الحيوية لموحودات الحمض الأميني غير المولد للبروتين مدفونة (مضمنة) في كتل NRPS، مثل أربعة إنزيمات ٤-OH-فينيل- جليسين (4- OH-phenyl-glycine) وأربعة أطر قراءة مفتوحة أخرى للبناء الحيوي لـ $3,5\text{-}(OH)_2$-phenylglycine (الشكل ١٦،٥) في صنف الفانكوميسين وتيكوبلانين من منتجي غليكوببتيد (هوبارد وآخرون Hubbard *et al.*, 2000، هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002، فان واجينينجين وآخرون Van Wageningen *et al.*, 1998). ويبدو بأن هذه الجينات تحركت ككاسيت (cassette) للكائنات الأخرى التي تصنع هذه الأحماض الأمينية غير العادية، وهذا يقترح إستراتيجية لتصدير قدرة البناء الحيوي هذه إلى أي كتلة. وإذا كانت كاسيتات ترادف الجينات هي القاعدة لبناء الحمض الأميني غير المُولد للبروتين، فالقابلية لتحريك مثل هذه الكاسيتات سوف تساعد في جهود إعادة البرمجة لخطوط تجميع NRPS.

ولقد بدأ ماراهيل وزملاؤه (Marahiel and colleagues) (للمراجعة، انظر دويكيل Doekel وماراهيل ٢٠٠١، كونز Konz وماراهيل Marahie ١٩٩٩) للعمل من خلال القواعد العملية لدمج حقول ووحدات NRPS الحفازة وقد أعادوا إنشاء هجين الأنظمة الثنائية - والثلاثية النموذجية (di-and trimodular systems)، مع مجالات فلق سلسلة ثيوإستيراز (chain-cleaving thioesterase domains) الموضوعة عند خطوط التجميع هذه المعاد إنشاؤها. وهذا النجاح يزيد احتمالية النهج الاندماجي لمبادلة الوحدة، الإدراجات والحذف لزيادة أو التقليل من عدد الأحماض المينية التي تم دمجها في داخل السلسلة النامية وتغيير هويتها عند مواضع محددة. وقد تم فم شفرة منطق الترميز لتمييز الحمض الأميني بواسطة أدنلة (adenylation) (A) الحقول لخطوط تجميع NRPS (ستاكيلهوس وآخرون Stachelhaus *et al.*, 1999)، سامحاً بإجراء إعادة البرمجة في الموضع. ولخطوط التجميع التي تولد فضالات D-amino acid residues عن طريق حقول فوق التقسيم (epimerization domains)، مثال التكوين (الشكل) D,D,L,D,D,L,L-configuration لفانكوميسين الببْتيد السباعي أجليكون (vancomycin heptapeptide aglycone)، ومن الممكن تعطيل نشاط حقول إيبيميراز (epimerase) لإدماج التكوين L-or D- configuration عند أي موضع. ومن المفترض بأن حقول التكثيف (C) في مثل خطوط التجميع هذه التي تعتبر مصبات للحقول E أن تكون نوعية (انظر هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002). وبالإمكان استخدام هذه في التجميع النموذجي ككواشف عامة لصنع روابط ببتيد D,L-,L,D-,and D,D في إطالات السلسلة.

الشكل (١٦,٥). أربعة كاسيتات – إنزيم للجيل الجديد من موحودات 4-OH-PheGly و$3,5\text{-(OH)}_2$-PheGly للبناء الحيوي لفانكوميسين وتيكوبلانين.

وكما هو الحال في خطوط تجميع PKS، هناك إنزيمات حياكة في خطوط تجميع NRPS، بعضها مدفون في *cis* والبعض يعمل في *trans*. وعلى سبيل المثال، N–ميثيل ترانسفيرازات (N– methyltransferases) (حقول MT) التي تنتج السبعة أحماض الأمينية (N-methyl amino acids) في أنديكابِبْتيد سيكلوسبورين أ الحلقي (cyclic undecapeptide cyclosporine A) توجد في أربعة – حقول (C-A-MT-PCP) (البروتين الحامل لِبِبْتيديل) لوحدات الإطالة (الشكل ١٦,٦A) مما يشير إلى قابلية نقل تكوين رابط البِبْتيد ونشاط ميثلة –ن N-methylation عند أي موضع NRPS. وبعض من أكثر المنتجات الطبيعية فضول لها خمس – حلقات كبريت وحلقات أكسجين غير المتجانسة، ثيازولات، وأوكسازولات، التي تنشأ من تحليق السلاسل الجانبية لسيستينيل -SH (cysteinyl-SH) و سيريل -OH (seryl-OH) على رابط ببتيد السابق كاربونيل (الشكل ١٦,٦B)، الحفَاز عن طريق تحليق حقول (Cy) والتي تعدُّ متغيرات حقول

التكثيف المكونة – لرابط ببتيد (Cy-A-PCP modules). وهذه قد تكون عناصر محمولة في النهج الاندماجي لخطوط تجميع NRPS. إنزيمات الحياكة لجزيئات NRP يمكن أن تكون oxidoreductases ، hydroxylases ، وglycosyltransferases.



الشكل (١٦،٦). إنزيمات الحياكة المدفونة في *cis* في خطوط تجميع NRPS: (A) N-methyl-transferases، (B) حقول التحليق لصنع حلقات اوكسازولين و ثيازولين.

من بين المنتجات الطبيعية الأكثر فائدة هي هجينات PKs وNRPs وتشمل بليوميسين (bleomycin)، إيبوثيلون (epothilone)، وبريستناميسين II (الشكل ١٦،٧). حوالي درزينة من خطوط تجميع هجين PKS-NRPS التي قد تم مؤخراً تسلسلها (انظر دويكيل Doekel، وماراهيل Marahiel ٢٠٠١، دو وآخرون Du *et al.*, 2001، هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002)، تظهر المنطق عن كيفية تمازج هذه الوحدات والحقول.

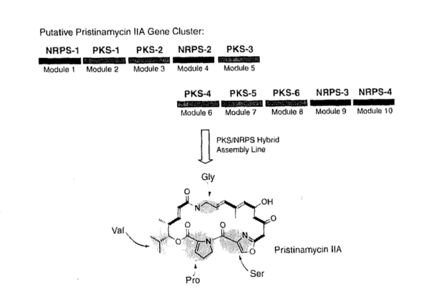
Bleomycin A2

Epothilone D

Pristinamycin IIA

الشكل (١٦،٧). جزيئات الهجين NRP-PKS: بليوميسين A2، إيبوثيلون D، و بريستناميسين IIA.

إعادة تكوين السطوح البينية لـ PKS-NRPS قد تم إنجازها بواسطة المركبات النقية في المختبر لتأسيس أنماط التمييز لحقول إطالة - السلسلة KS,C وCy المحفزة (ميللر وآخرون Miller *et al.*, 2002، باتيل ووالش Patel and Walsh, 2001)، كتأسيس للإستراتيجيات الاندماجية التي سوف تصنع تراكيب هجينات PK-NRP-PK جديدة. وعلى سبيل المثال، يعدُّ مركب بريستيناميسين II (الشكل ١٦,٨) من المضاد الحيوي هجين سينيرسيد NRP-PK-NRP-PK hybrid. ويفترض بأن خط التجميع يمتلك ١٠ وحدات لانتقاء الأربعة أحماض الأمينية (Gly,Ser,Pro,Val) وستة (ميثيل) موحودات مالونيل-CoA (الشكل ١٦,٨). وفي ترتيب الوحدة المفترض، سوف ينشط Gly بواسطة الوحدة ٤ والبِبْتيد الثلاثي Ser-Pro-Val tripeptide المتنوق بواسطة الوحدات ٩، ١٠ و١. والقسم الأول PK سوف ينشأ من الوحدات ٢ و ٣. وبعد إدخال جليسين، المط (المد) لأربع وحدات PKS، الوحدات ٥ - ٨، سوف يُجمَع جزء سلسلة PK ذات التسعة - كربون المتقدمة لوحدة البِبْتيد الثلاثي Ser-Pro-Val. وجميع الأربعة وحدات PK-NRP-PK-NRP سوف تستطيع في الأصل أن تُعالج على حدة واندماجياً.



الشكل (١٦,٨). بريستسناميسين II هو منتج لخط التجميع الهجين المفترض من الوحدات NRP-PKS-NRPS-PKS.

وبالتناظر مع مضادّات ماكرولاكتون الحيوية التي ذكرت أعلاه، بعض NRPs كذلك مرتبطة بالهيدروكسيل (hydroxylated) مرتبطة بالغليكوزيل (glycosylated) في خطوات النضوج الإنزيمي في ما بعد - خط - التجميع. وبالإمكان كذلك إجراء النهج نفسه لاختبار النوعية المبدّلة لسيتوكروم P450 hydroxylases والمرحلتين لتغيير مجموعة غليكوزيل، معالجة مسار TDP-deoxyhexose واستبدال غليكوزيل ترانسفيراز و/أو إرخاء النوعية. وعلى سبيل المثال، الإنزيمات في المسار الذي يحول TDP-glucose إلى TDP-L-epivancosamine قد وصفها جميعاً (تشين وآخرون Chen *et al.*, 2000)، وإستراتيجيات الاستبدال أو الحذف كما شرحت أعلاه في نظام بيكروميسين بالإمكان محاولتها

لتغيير هوية السكر. ومن المحتمل بان أحدهم يستطيع أن يستعمل مكتبة TDP-deoxyhexoses وaminohexoses- ومجموعة من إنزيم ناقلة الغليكوزيل (غليكوزيل ترانسفيرازات) (لوسي وآخرون Losey *et al.*, 2001، سولينبيرج وآخرون Solenberg *et al.*, 1997) لزخرفة مكتبة ببتيد أغليكونات وإيجاد تواليف جديدة. وكمثال، أغليكون من الفانكوميسين قد تم إضافة الغلوكوز له (glycosylated) مع TDP-glucose وبعد ذلك epivancosamine عن طريق اثنين GtfS، واحدة من كتلة فانكوميسين (GtfB) وواحدة من كتلة كلوروإرمومسين (GtfC) (الشكل ١٦,٩) لإنتاج غليكوببتيد إيبيفانكوساميسين غير الطبيعي-L (epivancosamycin). وتعمل نفس Gtfs الاثنين على أجليكون من تيكوبلانين لتنتج نظير تيكوبلانين جديد.

الشكل (١٦,٩). البناء الحيوي الإنزيمي لهجين الغليكوببتيدات في صنف فانكوميسين بواسطة تواليف TDP-sugars ومبادلات غليكوزيل ترانسفيرازات.

المُرضات المسبِّبة للمشكلات

- المكورة العنقودية المقاومة للمثسيلين (MRSA).
- المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوميسين (VRSA).
- المكورة البرازية المقاومة للفانكوميسين (VRE).
- المكورة العقدية الرئوية المتعدِّدة المقاومة – للدواء.
- المتفطرة السلية المتعدِّدة المقاومة – للدواء.
- السالمونيلا المتعدِّدة المقاومة – للدواء (مثال، السالمونيلا من نوع السلالة DT104 المقاومة للأمبيسيلين، كلورامفينيكول ، ستربتوميسين ، سلفوناميدات ، ترايميثوبريم، تتراسيكلين، كاناميسين ، سبروفلوكساسين).



المُرْضات المسبِّبة للمشكلات. الفحص بالمجهر الإلكتروني للمكورات المعوية المقاومة – للفانكوميسين التي تعرضت للفانكوميسين، مع إدراج خلية كونترول تامة النمو في مرق تريبتيكيز فول الصويا وحيدة. وحدة بار = 1µm (بالإذن من لوريان وفيرنانديز Lorian and Fernandes, 1997).

الفصل السابع عشر

السياقات والتحديات لاستعمال المضادّات الحيوية الجديدة

CONTEXTS AND CHALLENGES FOR THE USE OF NEW ANTIBIOTICS

الجهود التي شرحت في الفصلين الخامس عشر والسادس عشر، لتحديد هوية وتقييم الأهداف الجزيئية والخلوية الجديدة للمضادّات الحيوية لإيجاد تراكيب جزيئية في الأصناف الأدوية المضادة للجراثيم الجديدة، سيتم نتناولها في سياق البكتيريا المُمْرضة المقاومة – للدواء؛ إضافة إلى العداوى الناشئة الجديدة. الأعمار الزمنية المفيدة للمضادّات الحيوية الحالية والمستقبلية سوف تعتمد على سرعة تطوُّر المقاومة ومن ثمَّ على أنماط استعمال المضادّات الحيوية، ليس كمعالجات للإنسان فحسب ولكن كذلك في تربية الحيوانات الداجنة، الزراعة، والبستنة. ما لم يتم دعم البنى التحتية للصحة العامة والمراقبة العالمية وتُطبّق نظم رصد البكتيريا المُمْرضة قبل اختيار المضادّات الحيوية فإننا سنهدر فرصة الاستغلال الأقصى لفعاليّة المضادّات الحيوية.

في عصر ما قبل المضاد الحيوي، بعض من ١٠٠ عام مضى، كانت العداوى البكتيرية هي الأسباب الثلاثة الرئيسة للموت في الولايات المتحدة: الدرن (السل)، الالتهاب الرئوي وعداوى الجهاز الهضمي (وينزيل وإدموند Wenzel and Edmond, 2000) قدرت بنحو ٣٠٪ من الوفيات، وكان متوسط العمر المتوقع للإنسان هو ٤٧ عاماً (كوهين Cohen, 2000) .أما في نهاية القرن العشرين وفي العالم المتقدم فلم يتبق سوى عداوى الجهاز التنفسي السفلي من ضمن أهم عشرة أسباب للوفيات. وبتحديد أكثر، في الثمانية عقود الممتدة من ١٩٠٠ – ١٩٨٠م، كانت وفيات الأمراض المعدية في العالم المتقدم قد هبطت من ٧٩٧/١٠٠,٠٠٠ إلى ٣٦/١٠٠,٠٠٠؛ وذلك نتيجة تحسين الصحة العامة وأثر المعالجات المضادة للجراثيم. ولكن شهدت الخمسة عشر عاماً من ١٩٨١ – ١٩٩٥م ارتفاع في معدلات الوفيات من تلك ٣٦/١٠٠,٠٠٠ إلى ٦٣/١٠٠,٠٠٠ (ارتفع متوسط العمر إلى ٧٦ عاماً)، مما يعكس التغييرات في أنماط الأمراض المعدية (كوهين Cohen, 2000). لم يكن للعالم النامي مثل قصة النجاح هذه، مع ١٣ مليون حالات وفيات متعلقة بالأمراض المعدية في ١٩٩٨م، تقريباً ربع مجموح حالات الوفيات العالمية. والأمراض البكتيرية الكبيرة – الالتهاب الرئوي، والسل، والأمراض الإسهالية – ما تزال سائدة في العالم النامي.

شيوع الاستعمال غير المرشد للمضادّات الحيوية له عواقب على مقاومة المضادّات الحيوية

بالإضافة إلى الأمثلة التي أدرجت أعلاه وفي مكان آخر في هذا الكتاب، حذر وينزيل وإدموند Wenzel and Edmond, 2000) بأن الدراسات الوبائية أشارت إلى أن معدل حدوث الالتهاب الرئوي المكوراتي العنقودي (pneumococcal pneumonia) ارتفع في الأطفال الصغار، في خلال فترة ١٥-عاماً انتهت في ١٩٩٨م في غرب فيرجينيا، من ٢١/١٠٠,٠٠٠ إلى ٤٥/١٠٠,٠٠٠. وهذه الزيادة لم تكن محصورة فقط على السكان من الأطفال. فمجموعة المسنين، البالغة من العمر من ٧٠ - ٧٩ عاماً، كذلك شاهدت أكثر من ضعف معدل الحدوث، من ١٥/١٠٠,٠٠٠ إلى ٣٩/١٠٠,٠٠٠. علاوة على أن المرضى المصابين بفيروس نقص المناعة البشري (human immunodeficiency virus) ذوي الالتهاب الرئة الغزوي (invasive pneumonia) كان معدل الوفيات لديهم أعلى بثمانية - أضعاف تقريباً إذا كانت المكورة الرئوية مقاومة للبنسيلّين، مُعززة التفاعلات المميتة بين المُمْرضات الجديدة والقديمة. ولاحظ وينزيل وإدموند (Wenzel and Edmond) كذلك بأن للعداوى المستشفوية (nosocomial infections) لمجرى الدم معدلات وفيات عالية ٢١٪: في العداوى المكوراتية العنقودية السالبة للكواغيوالاز (سالبة للمخثر) (coagulase negative)، ٢٥٪ في عداوى المكورة العنقودية الذهبية، و٢٥٪ في العداوى المكوراتية البرازية. معدلات الحدوث العالية لمقاومة المضاد الحيوي في هذه المُمْرضات الثلاث المميتة (مع ٨٠٪ منها مقاومة للمشسيلين، ٣٠٪ مقاومة للمشسيلين، و٢٠٪ مقاومة للفانكوميسين، بالترتيب) شاركت في تقليل الخيارات المتاحة للعلاج والنتائج السيئة. ومن ضمن سكان الولايات المتحدة البالغ ٢٧٥ مليون نسمة، هناك ١٦ مليون وصفة و٣٢ مليون كيلوجرام من المضادّات الحيوية (وينزيل وإدموند Wenzel, and. Edmond, 2000) وُصفت سنوياً. وفي ١٩٩٢م، ١٨٪ من جميع الوصفات المضادة للبكتيريا في الولايات المتحدة كانت لعداوى الجهاز التنفسي. وأحد النتائج كان الضغط الانتقائي (selective pressure) القوي في المكورة العقدية المقاومة - للدواء.

لقد وُصف البشر مؤخراً بالقوة الأعظم تأثيراً على التطوُّر في العالم (بالومبي Palumbi,2001)، مع تغييرات دراماتيكية في بيئة العالم والمحيط الحيوي العالمي كنتيجة للأنشطة والتدخلات البشرية. التغييرات التطوُّرية السريعة التي يُحدثها تشمل الضغوط لنقل مقاومة المضاد الحيوي نادرة الحدوث في الجمهرات البكتيرية الطبيعية إلى انتشار- عالٍ والاكتساب السريع لسمات مقاومة جديدة. يبين الجدول (١,١) في الفصل الأول السنة الأولى لنشر المضادّات الحيوية التي قد كانت لها الأهمية الكبرى في معالجة الإنسان في السنوات السبعين الماضية وتواريخ اكتشاف المقاومة السريرية المعتدة، تمتد من ١ - ٣ سنوات قصيرة للعديد من أجيال بيتا - لكتامز إلى ٥ سنوات للتراسيكلين إلى ٣٠ + للفانكوميسين. في حين أن أطنان هائلة من إنتاج المضاد الحيوي من المحتمل أن للإنسان دور رئيس في إشعال فتيلة الآلة النشوئية للمقاومة الجرثومية الوراثية، ولاحظ بالومبي ضغط تطوُّري ناتج عن الاستخدام الواسع النطاق

للمضادّات الحيوية في الوقاية في تربية المواشي، تقدر من ٢٥٪ إلى ٥٠٪ من جميع إنتاج المضادّات الحيوية. وقد أضاف لذلك الجرعات الناقصة وفشل المرضى في إكمال دورات العلاج كعوامل تُسرع بتطور المقاومة فضلاً عن التقرير (نايكويست وآخرون Nyquist *et al.*, 1998) بأن ما يصل إلى ثلث وصفات المضادّات الحيوية التي كتبها أطباء الأطفال في الولايات المتحدة هي لأمراض الطفولة الفيروسية حيث لم يكن هناك استجابة مضادة بكتيرية ممكنة ميكانيكياً. بالومبي ذكر عدة طرق لكبح وتيرة تطور المقاومة للمضادّات الحيوية وتقع هذه الطرق تحت ثلاثة اتجاهات: (١) تنقيص التفاوت في السمة المتعلقة – باللياقة، (٢) الحد من الاختيار الاتجاهي (directional selection) (٣) تنقيص وراثة السمة المتعلقة – باللياقة (fitness-related trait). وفي الفئة الأولى أوصى بالمعالجة التوليفية (combination therapy) (مثال، سلفوناميد – ترايميثوبريم) والمراقبة المباشرة بواسطة النظام الطبي لضمان الجرعات الكاملة، كما هو المعيار في العلاج المتعدد للدرن. وللحد من الاختيار الاتجاهي، جادل بالمبي بأن تفاوت اختيار المضادّات الحيوية، الحد من التعرض للاختيار (مثال، حجب الأدوية – الملاذ الأخير مثل الفانكوميسين من الاستخدام العام)، وتجنب المضادّات الحيوية واسعة – المدى سوف يبطئ التطوُّر المكروبي. ونتناول عديد من هذه المسائل أدناه، وتشمل المناقشة حول تواليف ودورات (rotations) المضادّات الحيوية، وخطأ استعمال مناظرات فانكوميسين في التغذية الحيوانية، والمسئولية عن الاستخدام الواسع النطاق للكيفالوسبورينات الآمنة جداً، والواسعة – المدى.

المُمْرِضات متعدِّدة المقاومة للدواء والتحديات للمعالجة المضادة للبكتيريا

الأمراض البكتيرية الناشئة

من بين التحديات في تدبر العداوى البكتيرية هي تفشي الأمراض العدوائية الجديدة وظهور مشاكل في البكتيريا المطاعمة المعروفة والبكتيريا المُمْرِضة عن طريق اكتساب محددات مقاومة جديدة. تقرير الأكاديمية الوطنية للعلوم (National Academy of Sciences)، "الأمراض الناشئة والمعاد – نشوئها" "Emerging and Re-emerging diseases": التهديدات الميكروبية العالمية في التسعينيات (Global Microbial Threats in the 1990s) سردت الأمراض المعدية التي أصبحت معروفة منذ ١٩٧٣م (ديفيس وليديربيرج Davis and Lederberg, 2000). والأمراض البكتيرية في تلك الفئة مقتبسة في الجدول (١٧،١) وتشمل أشكال متلازمة الصدمة السمية (toxic shock syndrome) من المكورة العنقودية الذهبية، لجيونيلا نوموفيلا (*legionella pneumophila*)، واللولبية البوابية (*Helicobacter pylori*) المسبِّبة للقرحة–المعوية. في عالم السفر الدولي وتغيير مكان العيش، تنشأ أمراض جديدة. حالما يتم تحديد هويتها، معظمها تعالج في الوقت الحالي بالمضادّات الحيوية القائمة، ولكن هذا سوف يبدأ الطريق المتسارع لنشوء المقاومة للدواء. ومرافقة لذلك للأمراض الفيروسية الجديدة الناشئة قد لا تتوفر لها علاجات. لاحظ كوهين Cohen, 2000) بأن التغييرات في

الأنماط المجتمعية تسهم في تغيير أنماط المرض المعدي، مع الزيادة الهائلة في أعداد المرضى منقوصي المناعة الناجمة من عمليات زراعة الأعضاء ووباء فيروس نقص المناعة البشري. وهذا يسمح لمُمْرضات من الدرجة-الثانية (مثال، المكورات المعوية والزائفة الزنجارية) لتسبب المرض المهدد - للحياة . ظهور المراكز الضخمة السكانية، مع ١٠ - ٢٠ مليون نسمة في المدن الكبيرة بدون النظافة والمرافق الصحية الكافية ، قد وُصف بأنه قنبلة موقوتة لظهور أمراض معدية جديدة (جاريت Garrett, 1995). ومن المرجح بأن تتفشى الأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء؛ بسبب توفر الأطعمة الجاهزة للأكل والوجبات خارج المنزل. وسيرد في الأقسام التالية انتقال المُمْرضات الحيوانية مثل السالمونيلا المعوية ضرب تيفيميوريم *(Salmonell enterica serovar Typhimurium DT104)* والإشريكية القولونية *E.coli* O157:H7 خلال منتجات اللحم الملوثة.

الجدول (١٧,١). الأمراض البكتيرية الجديدة منذ ١٩٧٣م.

السنة	العامل	ملاحظة
١٩٧٧م	ليجيونيلا نوموفيلا *Legionella pneumophila*	مرض المحاربين القدماء legionnaire's disease
١٩٧٧م	العطيفة الصائمية *Campylobacter jejuni*	مرض معوي ، منتشرعالمياً
١٩٨١م	سلالات المكورة العنقودية الذهبية المنتجة للسم	متلازمة الصدمة السمية
١٩٨٢م	بوريليا برجدورفيري *Borrelia burgdorferi*	مرض لايم Lyme disease
١٩٨٣م	اللولبية البوابية *Helicobacter pylori*	مرض قرحة المعدة
١٩٨٩م	إهرليشيا تشافينسز *Ehrlichia chafeensis*	مرض إريلكيوسزالبشري Human erlchiosis
١٩٩٢م	الضمة الكوليرية *Vibrio cholerae* O139	سلالة جديدة ، الكوليرا الوبائية
١٩٩٢م	بارتونيلا هينسيلي *Bartonell henselae*	مرض خدش-الهر الورم (cat-scratch disease) الوعائي العصوي (bacillary andiomatosis)

البكتيريا المُمْرضة المقاومة للدواء في القرن الحادي والعشرون

ظهور المُمْرضات البكتيرية الجديدة ترافقها زيادة في الممرضات المعروفة التي اكتسبت ترسانة من المقاومة للأدوية. بعض الفاشيات الحديثة من البكتيريا المقاومة - للدواء وبعض المسائل لإستراتيجيات التحكم بالمضادات الحيوي أثيرت أدناه. وقد ذكر، كوهين(Cohen, 2000) كذلك العداوى التالية المكتسبة من المستشفى كمفتاح للتحديات في المعالجة في العقود الأولى من هذا القرن (الجدول ١٧,٢).

MRSA و VRSA

لقد كانت المكورة العنقودية المقاومة للمشسيلين (MRSA) ممرض بكتيري مسبب للمشكلات في المستشفى منذ انتشارها الواسع النطاق في السبعينيات (هيراماتسو وآخرون Hiramatsu *et al*., 2001). وتسلسل مجين سلالة MRSA

(كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) (انظر الفصل السابع) قد أثبت بأن جزيرة المقاومة المضاد الحيوي حوالي ٢١ إلى 67 kb ، SCC_{mec} تنتج النمط الظاهري. وقد تطوُّر SCC على مر أربعة عقود منذ اكتشف MRSA لأول مرة في ١٩٦١م ليستولي على جينات إضافية مقاومة للمضادّات الحيوية على البلازميدات المجدولة ويوفرالمقاومة المتعدِّدة- للمضاد الحيوي (هيراماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001). وتَطوُّر سلالات MRSA-التمهيدية (pre-MRSA strains) إلى مقاومة مثيسيلين كاملة غالباً ما تشمل طفرة القامع (الكابح) (MecI repressor) أو تسلسل DNA المشغَل لينزع قمع (derepress) انتساخ PBP2A (البروتين المرتبط بالبنسيلّين 2A) ترانسببتيداز (الفصل العاشر)، الذي له مثل الانجذاب المنخفض للمشسيلين وبيتالاكتامز الأخرى وإشباع PBP2A بواسطة البنسيلّين لا يمكن تحقيقه عند التراكيز السريرية للدواء.

التَطوُّر الأكثر خطورة هو ظهور سلالات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة لفانكوميسين (VRSA). وكانت سلالات MRSA عزلت في ١٩٩٦م في اليابان والتي كانت أيضاً غير المستجيبة للمعالجة بالفانكوميسين (انظر هيراماتسو Hiramatsu *et al.*, 1998). وتلا ذلك، فقد تم عزل سلالات VRSA أخرى من العديد من البلدان (هيراماتسو وآخرون Hiramatsu *et al.*, 2001)، مما يشير إلى الانتشار العالمي. وقد تم وصف تسلسل مجين سلالة Mu50 VRSA (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001)، ولكن الآلية الصحيحة للمقاومة لم تحدد بعد. وهي ليست آلية مقاومة المكورات المعوية – للفانكوميسين (VRE) ذات الخمس – جينات المعيارية (المذكورة في الفصل العاشر)، حيث تنتج نهايات ببتيدوغليكان D-Ala-D-Lactate ذات الانجذاب المنخفض لفانكوميسين. وبدلاً عن ذلك، يبدو بأن سلالات VRSA تطور (تنتج) جدار خلية سميك ويعاير كميات عالية من فانكوميسين عن طريق توفير مواضع ربط إضافية للدواء (ديفيس Davies, 1994).

الجدول (١٧,٢). البكتيريا المسبِّبة للمشكلات المستندة على- المستشفى والمجتمع.

العداوى المكتسبة – من المستشفى	المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المكورات المعوية المقاومة للفانكوميسين المكورات العنقودية المقاومة للفانكوميسين البكتيريا السالبة – لغرام المقاومة للكيفالوسبورين
العداوى المكتسبة – من المجتمع	المكورات الرئوية المتعدِّدة المقاومة – للدواء السالمونيلا المتعدِّدة المقاومة – للدواء الشيغيلا المتعدِّدة المقاومة – للدواء النيسيريات المقاومة – للفلوروكوينولون الدرن المتعدد المقاومة – للدواء

لا يوجد علاجات جيدة لسلالات المكورة العنقودية الذهبية التي هي كلا MRSA وVRSA في النمط الظاهري.
لاحظ هيراماتسو وآخرون Hiramatsu *et al*, 2001 ، بأن MRSA قد تصبح النبيت النهائي في البشر. "من الواضح بأن MRSA تغلبت على جميع المضادّات الحيوية المتوفرة وفرضت نفسها بمُمْرض المستشفى النهائي. وبافتراض المرونة الوراثية التي ظهرت في الماضي، فمن الواضح كذلك بأنها سوف تكتسب مقاومة لأي مضادّات حيوية جديدة تَطوُّرت في المستقبل". واختتموا بأن الطريق الوحيد للأمام هو إجراءات أفضل للتحكم - بالعدوى في المستشفى.

الإشريكية القولونية المُمْرضة

عداوى الجهاز البولي المكتسبة - من المجتمع عادة تسببها الإشريكية القولونية المُمْرضة البولية (*uropathogenic E.coli*)، والتي تنتقل من استعمار ظهاريات الجهاز الهضمي (GI epithelia) إلى القناة البولية مع إظهار جزيئات الالتصاق بالسطح (انظر الفصل التاسع) الضرورية للالتصاق إلى الظهاريات البولية (uroepithelium). والاستعمال واسع النطاق لتوليفة ترايميثوبريم - سلفاميثوكسازول في الولايات المتحدة ربما تكون قد أحدثت مستويات مسببة للمشكلات من المقاومة السريرية (ماجنيس وآخرون Magnes *et al*., 2001، ستام Stamm, 2001)، مع تناسب في الكائنات التي تصل مقاومتها ٢٠٪. وقد أنذر بذلك بواسطة ٣٠٪ إلى ٥٠٪ مقاومة في أجزاء من أوروبا، إسرائيل، وبنغلاديش (ستام Stamm, 2001). نشأت الفاشيات في النساء في كاليفورنيا، ميتشيجن، ومينيسوتا من نسيلة (clone) واحدة (مانجيس وآخرون Manges *et al*., 2001)، مما يدل على الانتشار الواسع النطاق للسلالة الفوعية، ربما خلال مصادر الغذاء الملوثة. والاختيار للمعالجة التالية لعداوى الإشريكية القولونية المُمْرضة البولية والتي تعد كذلك مقاومة للبنسيلّينات والكيفالوسبورينات الفموي إضافة إلى تتراسيكلين، الذي منح عن طريق بلازميد واحد (ساهم وآخرون Sahm *et al*., 2001، ستام Stamm, 2001)، وتبقى فلوروكوينولونات، ولكن ربما سوف يتفادى بواسطة التقارير عن سلالات الإشريكية القولونية المقاومة - للفلوروكوينولونات في عداوى الجهاز البولي.

ويحتمل بأن عناصر متعدِّدة تكون متورطة في هذه المقاومة، وتشمل الاستعمال الواسع النطاق لتوليفة - الدوائين لعدد من السنين واستعمالها الحديث كعامل توقية لالتهاب الرئة المستحث بالمتكيسة الرئوية الجؤجؤية *(Pneumocyctis carinii)* في المرضى منقوصي المناعة. استعمال ترايميثوبريم - سلفاميثوكسازول في غذاء الحيوانات يبدو من المحتمل كذلك بأنه قد أنشأ مستودعات مقاومة - الدواء المُمْرضة من الإشريكية القولونية في الحيوانات.

لقد تم التحقق من بقاء محددات مقاومة الدواء في سياق سلفوناميد - ترايميثوبريم في المملكة المتحدة حيث وضعت تقييدات على التوليفة في ١٩٩٥م وتلاها التحول إلى ترايميثوبريم وحده. وانخفضت الوصفات من ٣٢٠،٠٠٠ في السنة إلى ٧٧،٠٠٠ في السنة بين ١٩٩١ و١٩٩٩م (إيني وآخرون Enne *et al*., 2001). وفي ١٩٩٩م كان معدل انتشار مقاومة السلفوناميس في العزلات السريرية في الممارسة العامة في المملكة المتحدة نحو ٤٦٪، مقارنة

بـ ٤٠٪ في ١٩٩١م، مع اكتساب جينات لداي هيدروبيترويت سينثيتازغير الحساس - للدواء (drug-insensitive dihydropteroate synthase) (الفصل السادس)، على العناصر المتنقلة كسبب. إنه ليس من الواضح بعد ما إذا كان وقت إضافي سوف يؤدي إلى النقص شيوع المقاومة أو ما إذا كان الانتشار الواسع النطاق للمقاومة في عديد من السياقات الوراثية للإشريكية القولونية سوف يجعل من الصعب استبدال المحددات. إيني وآخرون Enne *et al*., 2001، لاحظوا استمرار بيع ٨٠ طن في السنة من سلفوناميد ترابيميثوبريم في إذا الحيوانات للعام ١٩٩٨م كخزان لصيانة السلالات المقاومة.

هذا يتناقض مع انخفاض مقاومة الإريثروميسين في المكورة العقدية القيحية *(Streptococcus pyogenes)* في فنلندا (سيبالا وآخرون Seppala *et al*., 1997)، ولكن في الآونة الأخيرة كانت تلك النسيلات (clones) قد تَطوُّرت من المكورة العقدية القيحية، وليست متعدِّدة المقاومة - للدواء، وربما لم يكن لديها الوقت الكافي لتصبح بالكامل الأمثل للبقاء على قيد الحياة.

السالمونيلا الضرب المصلي تيفيميوريم DT104 (Salmonell serovar Typhimurium DT104)

لقد انتشرت سالمونيلا الضرب المصلي تيفيميوريم DT104 بشكل كبير كمُمْرض متعدد المقاومة - للدواء في المرضى في أوروبا الغربية وأمريكا الشمالية (ثريلفول Threlfall, 2000). وهذه السلالة قد اكتشفت لأول مرة في النوارس في الثمانينيات، وأصبحت واسعة التوزيع في المواشي في المملكة المتحدة في أوائل التسعينيات، وانتشرت في البشر من خلال السلسلة الغذائية. وقد تورطت في العداوى البشرية في جميع أنحاء الإتحاد الأوروبي، كندا، والولايات المتحدة. وهذا المرض عادة مقاومة للأمبسيلين، كلورامفينيكول، ستربتوميسين، سلفوناميدات وتتراسيكلين، عن طريق كاسيت الجين الذي يحتوي على الجينات التي ترمز ANT(3")-1a aminoglycoside nucleotidyltransferase والـ CARB-2(PSE-1) بيتالاكتاماز الذي يحيط بالجينات - المقاومة لكلورامفينيكول أسيتيل ترانسفيراز وتتراسيكلين (بريجز وفراتاميكو Briggs and Fratamico, 1999). وأفاد بالعزلات ذات المقاومة الإضافية لترايميثوبريم (الطفرة لثنائي هيدروفوليت ريدكتاز المقاومة - للدواء) وسبروفوكساسين (طفرات Asp87 في الوحدة الفرعية GyrB) للسلالات DT104 (انظر ثريلفول Threlfall, 2000) (الشكل ١٧,١)، مما يجعل هذه السلالات مشكلة بشكل خاص مع كامل ترسانتها المقاومة للمضاد الحيوي. ولم يستجب أربعة من ١١ مريضاً منومين بمثل هذه العداوى في الدنمارك في ١٩٩٨م للسبروفولكساسين، مع وفيتان (مولباك وآخرون Molbak *et al*., 1999). وهذه الحالة تعدُّ رمزاً لمقاومة الدواء في المُمْرضات الحيوانية المنشأ، حيث استخدام الأدوية المضادة البكتيرية في الماشية وعلف (غذاء) الحيوانات يضمن العمر القصير لاستعمال المضاد الحيوي في البشر. ولقد لاحظ ثريلفول Threlfall, 2000، بأن اكتساب المقاومة للسبروفلوكساسين في عداوى الضرب المصلي تيفيميوريم DT104 في البشر في المملكة المتحدة تبع الترخيص لنظير

سبروفلوكساسين، إنتيروفلوكساسين (enterofloxacin)، للاستخدام البيطري في أواخر ١٩٩٣م، حيث اكتسب استعمال واسع معامل توقية بيطري. وقد أشار بأن إنتيروفلوكساسين قد ووفق عليه بواسطة إدارة الغذاء والدواء في الولايات المتحدة للاستخدام في الخنازير والماشية. وهذا ربما يُنذر بانتشار المقاومة للفلوروكيونولون لهذا المُمْرض في البشر في الولايات المتحدة ودعا علناً وبكل قوة من اجل نهج مختلف لكل من المسح والترخيص لمناظرات للفئات المنقذة للحياة من المضادّات الحيوية للبشر. وقد تم تحديد التسلسل الجيني لاثنين الضرب المصلي لسالمونيلا إنتيريكا: للضرب المصلي تيفيميوريم LT2 (مك ليلاند وآخرون McLlelland *et al.*, 2001) وللضرب المصلي تيفيميوريم CT18 (بارخيل وآخرون Parkhil *et al.*, 2001)، تسبب السابقة التهاب المعدة والأمعاء (gastroenteritis)، والأخيرة تسبب حمى التيفويد (typhoid fever).

أميسيلين	ترايميثوبريم
كلورامفينيكول	تتراسيكلين
ستربتوميسين	كانامیسین
سلفوناميد	سبروفولكساسين

الشكل (١٧,١). الأنماط الظاهرية للمقاومة – المتعدِّدة للمضادّات الحيوية للسالمونيلا إنتيريكا الضرب المصلي تيفيميوريم DT104.

العواقب الطبية لاستخدام المضادّات الحيوية في الزراعة

بينما تعدُّ المستشفيات بوضوح ميادين خصبة لانتقاء البكتيريا الممرضة المقاومة – للمضادّات الحيوية، الميدان التكميلي الذي قد فهم على مدى عقود هو استخدام المضادّات الحيوية في الغذاء الحيواني لتعزيز النمو والوقاية من الأمراض المعدية (انظر ويتي Witte, 1998). وانتشار الجينات المقاومة على الترانسبوزونات والبلازميدات (ديفيس وليديربيرج Davis and Lederberg, 2000، ليفي ١٩٩٨) يعني أن علف الحيوانات هو مستودعات مهمة لنقل المُمْرضات الحيوانية المنشأ على النحو المفصل أعلاه لانتشار السالمونيلا المتعدِّدة – المقاومة الضرب المصلي تيفيميوريم DT104 في منتجات اللحوم وسلالات الإشريكية القولونية المقاومة – لسلفوناميد – ترايميثوبريم. ثلاثة أمثلة أخرى تعمل على تعميم النقطة. ويتناول الأول نظير مضاد غليكوببتيد الحيوي فانكوميسين، أفوبارسين (avoparcin)، الذي يستعمل بشكل واسع في الأعلاف الحيوانية. في ١٩٩٤م، يقدر بنحو ١,٠٠٠ من أفوبارسين (٢٤,٠٠٠ كجم) الذي استخدم في الدنمارك كوسيط زراعي كفانكوميسين (٢٤كجم) في المعالجات في الإنسان. النوع نفسه من الخمس–جينات *vanRSHAX* (الفصل العاشر) المقاومة لأفوبارسين تحدث في الحيوانات ويمكن أنت تنتقل عن طريق الحيوانات. وفي أستراليا في ١٩٩٢ إلى ١٩٩٦م كان هناك ١,٠٠٠ أضعاف مماثلة لزيادة استعمال أفوبارسين في مزارع

الحيوانات مقارنة باستعمال فانكوميسين لأمراض البشر (ويتتي Witte, 1998). وتبدو هذه سياسة محفوفة بالمخاطر للغاية والتي تضمن عملياً انتقاء والمحافظة على المقاومة ولاسيما إلى صنف تبعي من المضادّات الحيوية المنقذة للحياة. وفي الواقع، الاتحاد الأوروبي ماضي في حظر استخدام أفوبارسين في علف الحيوانات.

وبالنسبة للعداوى المكوراتية البرازية المهددة - للحياة التي هي بذلك مقاومة للفانكوميسين، توليفة بريستيناميسين (الفصل الرابع) فقد تمت مؤخراً الموافقة عليها. وهذه هي أعضاء من عائلةستربتوجرامين، وظهرت المقاومة على الفور في بعض المرضى في ألمانيا (انظر ويتتي Witte, 1998)، مما يعكس على الأرجح وجود مخزن مهم للجينات المقاومة في الحيوانات؛ بسبب ٢٠ سنة من الاستخدام المسبق من ستربتوجرامين فيرجينياميسين ذا العلاقة (الفصل الحادي عشر) في الأعلاف الحيوانية. استخدام الأصناف المهمة من المضادّات الحيوية البشرية، أو المضادّات الحيوية البشرية المحتملة، في الأعلاف الحيوانية يمكن أن يضع قيوداً شديدة على حياتها العمرية اللاحقة وفائدة هذا الصنف في المعالجات في الإنسان. كما أنها تؤثر سلباً على المستقبل.

المثال الثالث ينشأ من استعمال فلوروكوينولون في التوقية ضد المرض العدوائي (١٢٠ طناً في الحيولنات، ٨٠٠ طن في الإنسان سنوياً) في صناعة الدواجن (فالكو وكينيدي Falkow and Kennedy, 2001، جونت وبيدوك Gaunt and Piddock, 1996)، التي إنتقت السلالات المقاومة - لفلوروكوينولون من العطيفة الصائمة (*Campylobacter jejuni*). الانتقالات من الحيوانات هي المصدر المشتبه للمرض الإسهالي في الإنسان الذي سببته العطيفة الصائمية (٢,٤ مليون حالة في الولايات المتحدة سنوياً (إنجبيرج وآخرون Engberg *et al*., 2001)، موازياً مرض السالمونيلا المقاومة - لفلوروكوينولون. وقبل استعمال كوينولونات في مزارع الدواجن، مثل هذه العطيفة المقاومة - للدواء لم تكن تشاهد في الإنسان بدون التعرض المسبق للفوروكوينولون (جونت وبيدوك Gaunt and Piddock, 1996، ويتتي Witte, 1998). ولكن من ١٩٩١ إلى ١٩٩٨م ارتفعت مقاومة سبروفلوكساسين في العطيفة من ٠ إلى ١٣,٦٪ (كوهين Cohen, 2000).

وهذه ليست بالضبط مشكلة جديدة. فقد أوصت لجنة سوان (Swann Committee) في المملكة المتحدة في ١٩٦٩م بوضوح بأن المضادّات الحيوية التي تستخدم في معالجة الإنسان لا يمكن استخدامها كمسرّعات للنمو في الحيوانات. وهذه التوصيات تشمل أصناف الأدوية، وليس فقط الجزيئات المحددة، وإلاّ فثغرات أفوبارسين/فانكوميسين يحصل لها إعادة مستمرة للصياغة. ورشة عمل منظمة الصحة العالمية بعد ٢٨ عاماً اللاحقة في ١٩٩٧م كررت هذه التوصيات بالقوة (انظر ويتتي Witte, 1998). والاستنتاجات لم تكن جديدة، ولكن ثلاثة عقود من الضرر تلت. ولم يحسم الوضع بعد في العالم المتقدم، ويتبين ذلك من موافقة إدارة الغذاء والدواء لاستخدام إنتيروفلوكساسين (enterofloxacin) في علف الحيوانات، كما ذكر سابقاً. وبالفعل، فاثنين من التقارير قد ظهرت مؤخراً في الولايات

المتحدة عن السالمونيلا والمكورات البرازية المقاومة للمضاد الحيوي التي نقلتها – للأغذية (ماك دونالد وآخرون McDonald *et al.*, 2001، وايت وآخرون White *et al.*, 2001)، جنباً إلى جنب مع الافتتاحية الآذعة لرئيس تحرير مجلة نيو إنجلاند للطب *(the New England Journal OF medicine)* (جورباتش Gorbach, 2001) بعنوان "استخدام مضادّات المكروبات في العلف الحيواني – حان الوقت للتوقف" "Antimicrobial Use in Animal Feed-Time to Stop".

وبما أن المقاومة للمضادّات الحيوية تبدو بوضوح مشكلة عالمية، وعدم وجود سياسات في العالم النامي، الذي يعدُّ مسئول عن ٢٥٪ من إنتاج اللحوم في العالم، هو واقعياً إشكالية. السياسة لتجنب أي جرعات تحت العلاجية (subtherapeutic doses) من العوامل المضادة للمكروبات (والتخلي عن ٤ إلى ٥٪ من التحسن في وزن الجسم التي يوفرها الدواء) يبدو أنه الطريق الأكثر حكمة وعقلانية لضمان أن يكون هناك مضادّات حيوية باقية للعداوى البكتيرية المهددة – للحياة في الإنسان (مثال، انظر فالكو وكينيدي Falkow and Kennedy, 2001). وأخيراً، تذهب المشكلة أدنى من تربية الحيوانات، بل هي أيضاً في ممارسة الزراعة والبستنة حيث كميات كبيرة من المضادّات الحيوية البشرية، وإن كانت قديمة، يتم رشها في البيئة. ففي الولايات المتحدة في ١٩٩٦م، تم رش ٣٠٠.٠٠٠ طن من ستربتوميسين وأوكسيتتراسيكلين على التفاح والكمثرى كتوقية ضد العداوى (ورشة عمل NAS عن الأمراض المعدية الناشئة) (NAS workshop on Emerging Infectious Diseases) (ديفيس وليديربيرج Davis and Lederberg, 2000).

الكيفالوسبورينات : النجاح الواسع النطاق يؤدي إلى فرط نمو الكائنات المقاومة المحتملة المُمْرِضة

من المتفق عليه أن استخدام المضاد الحيوي سوف يولد المقاومة في جمهرة البكتيريا، كما درس على نحو متسع خلال هذا الكتاب. الاستعمال الواسع النطاق للكيفالوسبورينات، كالأكثر وصفاً، أماناً، وكمضادّات حيوية واسعة – المدى، ربما وبشكل متناقض قد ساهمت ليس فقط ظهور الكائنات المقاومة–لبيتالاكتام ولكن أيضاً في انتقاء، تكاثر، وفرط النمو لعديد من المكروبات المشكلة (دانسر Dancer, 2001). تنتقي المعالجة بالكيفالوسبورين فرط النمو لكلا المكروبات المطاعمة مثل المكورات العنقودية السالبة – لكوأجيوليز، الزائفة الزنجارية، ومختلف المكورات المعوية فضلاً عن المُمْرِضات الأكثر عدوائية، مثل المطثية العسيرة *(Clostridium difficile)*، MRSA، المكورات العقدية المقاومة – للبنسيلّين، والأشكال المتعدِّدة – المقاومة من الإشريكية القولونية والسالمونيلا.

في المستشفيات حيث الكيفالوسبورينات تعدُّ الأدوية الرئيسة التي تعطى للتوقية المضادة للبكتيريا قبل الجراحة، قد يكتسب المرضى المكورات العنقودية السالبة – للكوأجيوليز (دانسر Dancer, 2001) خلال ساعات من الدخول. وهذه البكتيريا المقاومة – للمشسيلين تتكاثر على وفي داخل المرضى الذين يتلقون علاجاً بالكيفالوسبورينات

وهي عداوى سائدة في المرضى بالقثاطر والبدلات الاصطناعية. وتناظرياً، فاستعمال الكيفالوسبورينات في المستشفى يصاحبه فرط نمو وانتعاش الزائفة الزنجارية، مع انخفاض الحساسية الفطري للبيتالاكتامات. وبإمكانهم أن يتطفروا في وجه المعالجة المستمرة لمقاومة الاكتام. وذكرنا في الفصل السابع بأن فرط نمو المكورات البرازية يصاحب استخدام الكيفالوسبورين؛ لأنهم يستعمرون مواضع القناة الهضمية التي كانت مأهولة بسكان البكتيريا الحساسة- للدواء، والآن أُبيدت بواسطة المضادّات الحيوية. وتنطبق الحجة نفسها على المطثية العسيرة، العامل المسبب للإسهال المصاحب – للمضاد الحيوي، بوصف البكتيريا تستولي على المحاريب المحتلة مسبقاً بواسطة الكائنات الحساسة – للدواء. ولاحظ (دانسر Dancer, 2001) بأن فرط نمو المطثية العسيرة قد أدى إلى فرض القيود على استعمال الكيفالوسبورينات في بعض السكان المسنين وهذا الاستخدام الواسع النطاق للكيفالوسبورينات في الثمانينيات قد لعب دوراً مهماً في نشوء وانتشار MRSA في مستشفيات لندن وفي طوكيو إضافة إلى انتقاء سلالات الإشريكية القولونية وإنتيروباكتر كلواكي *(Enterobacter cloacae)* مع عديد من المتغيرت الطفرية من بيتالاكتامازات المُرمّزة – بالبلازميد. وإختتم بالملاحظة: "يبدو أنه من غير المرجح، بأننا سوف نشهد الزيادة الغزيرة للكائنات المتعدِّدة – المقاومة إذا لم تكن الكيفالوسبورينات قد قُدمت. وذلك لأن القليل من العوامل القائمة قدمت مثل النشاط الواسع – المدى، ومثل السُمِية المنخفضة، وبذلك لم تكن مقررة عالمياً. ومجموعة أكبر من المضادّات الحيوية قد استخدمت، وتنشر الانتقاء المحتمل".

هذه ليست سوى خصائص كان المرء أرادها من البداية لمضادّات حيوية جديدة ويثير الحذر الواضح بأن الآن وفي المستقبل، حتى مع وجود المضادّات الحيوية الأكثر واعدة، الاستخدام المنخفض للمضادّات الحيوية، القسري خلال تثقيف الأطباء والمرضى، وبصرامة يتبع المبادئ التوجيهية الممارسة ولن يعزز فقط الحياة المفيدة للمضاد الحيوي المحدد ولكن أيضاً الانخفاض في معدلات فرط نمو المكروبات ذات القدرات الطبيعية والمكتسبة للمقاومة. وكلما زاد تواتر السلالات المقاومة – للمضاد الحيوي، الأبطأ سيكون إعادة إنشاء السلالات الحساسة كنبيت غالب على انسحاب المضاد الحيوي (ليفي Levy, 2001).

الإستراتيجيات للتحكم في مقاومة الدواء المضاد للمكروبات

على مدى السنوات القليلة الماضية كانت هناك زيادة في فهم الحاجة لوضع سياسات المضادّات الحيوية المنقحة للتحكم في مقاومة المضاد الحيوي (جولد Gould, 1999، كونين Kunin, 1997، ليفي Levy, 1992، مكجوان وتينوفر McGowan and Tenover, 1997، شليز وآخرون Shlaes et al.1997a, 1997b). وقد تضمن هذا كل من النهج السريرية والوبائية لتقييم الطرق الرئيسة وأسباب ظهور وانتشار مقاومة المضادّات المكروبية في كائنات المستشفى وفي مجالات المجتمع، مع التقدير لديناميكيات المجتمع (شليز وآخرون Shlaes et al.,1997a) التي تجادل للمبادئ الأربعة من الجدول (١٧,٣).

توصيات الاستعمال الأمثل تحتاج إلى دمج جميع الملاحظات الواردة في هذا الفصل وربما تشير نحو الأدوية الضيقة – المدى بدلاً من الواسعة – المدى لمعالجة العداوى البكتيرية. وللقيام بذلك بشكل فعال سوف يتطلب الانتقال من المعالجة التجريبي (empiric therapy) الحالي حيث العوامل المسبِّبة غير المعروفة حتى يوم أو يومين بعد بدء العلاج. وفي المستقبل القريب سوف يوفر اختبار تفاعل سلسلة حافز البلمرة – الوقت الحقيقي المتعدد (multiplexed real-time PCR analysis) التشخيص النهائي للبكتيريا المُمْرِضة وجردها من الجينات المقاومة المعروفة وتوفر خياراً أمثل للمضادّات الحيوية الضيقة – المدى مع التقليل من خطر حث المقاومة في النبيت البكتيري للمريض.

الجدول (١٧,٣). التوجيهات لتمديد العمر المفيد للأدوية المضادة الميكروبية.

١- الاستعمال الأمثل لجميع الأدوية المضادة البكتيرية.
٢- التخلص الانتقائي، التحكم، أو تقيد أصناف من العوامل المضادة البكتيرية.
٣- استعمال الأدوية المضادة البكتيرية في أنماط التناوب أو التدوير.
٤- استعمال المعالجة المضادة البكتيرية التوليفية لإبطاء ظهور المقاومة.

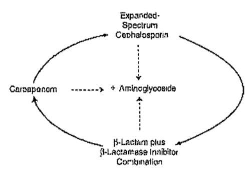
بالإذن من (شليز وآخرون Shlaes *et al.*,1997a).

التخلص الانتقائي وتوصية التحكم تتطلب بأن يغير المرضى والأطباء أنماط الوصفة الطبية والتوقعات نحو التوازن الأكثر فعاليّة بين حاجة المريض الفردية مع متطلبات الصحة العامة التي تنشأ من عبء المضادّات الحيوية في البيئة. مرة أخرى، وهذا سيتعين بأن يقترن أفضل كثير مع التشخيص في الوقت الحقيقي للمُمْرِض لتوجيه إستراتيجيات المعالجة، بما في ذلك المسببات الفيروسية مقابل البكتيرية في عداوى الجهاز التنفسي.

التوصية لتدوير المضادّات الحيوية، وبالتحديد في أوضاع المستشفى، هو جزء من إستراتيجية التحكم بالعدوى ومسح المُمْرِض. لخص جولد (Gould,1999) الخطة لتدوير المضاد الحيوي في وحدات الإنتان (sepsis) (الشكل ١٧,٢). خط العلاج الأول سوف يبدأ بواحد من فئات بيتا لكتام الثلاثة الرئيسة، على سبيل المثال، بيتا لكتام زائد مثبط لاكتاميز (مثال، توليفة الأموكسيسيلين – كلافولينيت). وبعد شهرين من شأن الوحدة التدوير إلى مضادّات كاربابينيم الحيوية كعلاج خط أمامي. وعند نهاية الشهرين القادمين، الجيل الثالث – أو الرابع (الممتد –المدى أو أعلى) من الكيفالوسبورين سوف يصبح اختيار الخط – الأمامي. وبعد ذلك، بالإمكان العودة لاختيار الدورة التوليفة الأولية، مكملاً اجتياز الثلاثة – أدوية في فترة ٦- أشهر.

وتوصية العلاج – التوليفي، حيث يستعمل اثنان من الأدوية في نفس الوقت للتقليل من احتمالية الطفرة للمقاومة الهامة سريرياً، وتتمثل في الخطة المشار إليها أعلاه بواسطة توليفة أموكسيسيلين – كلافولينيت. وهي في الممارسة في توليفة سلفوناميد – ترايميثوبريم وفي زوج سينيرسيد من البريستيناميسينات الذي أدخل مؤخراً. النماذج

التي تقيم بروتوكولات العلاج لتمنع مقاومة المضاد الحيوي (بونهويفير وآخرون Bonhoeffer *et al.*, 1997) تدعم العلاج التوليفي (combination therapy) كإستراتيجية المعالجة المثلى. وهو العيار في معالجة الدرن في جميع أنحاء العالم. وقد جادل درليكا (Drlica,2001) بأن جرعات المضادّات الحيوية يجب أن تكون عالية بما يكفي لوقف الإغناء الانتقائي للطفرات المقاومة. على الرغم من أن طفرات المقاومة سوف تُولد إذا كان بالإمكان الاحتفاظ بها ككسر ضئيل من السكان (جمهرة البكتيريا) بواسطة جعل التراكيز العلاجية أعلى من نافذة انتقاء الطفرة، وبعد ذلك سيتم عرقلة طفرة التوسع السكاني.



الشكل (١٧,٢). مقترح لتدوير المضاد الحيوي لمعالجة الإنتان البكتيري في المستشفيات (بالإذن من جولد Gould,1999).

إن تطبيق تدابير التحكم الناجحة هو في نهاية المطاف وطني وعالمي. وتحتاج البلدان إلى تطبيق توصيات منظمة الصحة العالمية ومراكز التحكم والوقاية من الأمراض (Centers for Disease Control and Prevention) من أجل نظام المسح الدولي (ويليامز وهيمان Williams and Heymann, 1998) لسلالات البكتيريا المقاومة لاتخاذ قرارات عقلانية عن ما يستخدم من المضادت الحيوية. وتشمل هذه (١) تعزيز المسح والاستجابة للمُمْرِضات الجديدة، (٢) المزيد من البحوث التطبيقية، (٣) تقوية البنية التحتية للصحة العامة، و(٤) توفير التدريب لتطوير، تطبيق، وتقييم الإستراتيجيات للوقاية والتحكم.

وفي الختام، فزيادة المعرفة الجزيئية حول الجينات البكتيرية الأساسية والقدرة على فحص هذه الأهداف المُثْبَتة مع مكتبات من المنتجات الاصطناعية الجديدة والطبيعية من المُرجح أن يصل إلى مضادّات حيوية جديدة ضد الأهداف البكتيرية غير التقليدية. ولكن جزيئات المضادّات الحيوية الجديدة بحد ذاتها سوف لن تُغير حركيات الدورات لتطوير المقاومة. وفي الواقع، الاستعمال الواسع والعشوائي للمضادّات الحيوية الجديدة يستطيع بالفعل تقصير زمن الدورة ويدفع لنشوء الممرضات البكتيرية الأكثر شراسة وفتكاً ما لم تحدث التغييرات السلوكية الموضحة في الجدول (١٧,٣) وينتج عنها التقدير اللائق للمضادّات الحيوية كموارد محدودة.

المراجع

Achari , A., D. O. Somers, J. N. Champness, P. K. Bryant, J. Rosemond, and D. K. Stammers.
1997. Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase
.
Nat. Struct. Biol. **4:**490-497.
Admiral, S. J., C. T. Walsh, and C. Khosla. 2001. The loading module of rifamycin synthetase is an adenylation-thiolation didomain with substrate tolerance for substituted benzoates. *Biochemistry*
40:6116-6123.
Allen, N. E. 1985. Non classical targets for antibacterial agents. *Annu. Rep. Med. Chem.* **20:**155-162.
Amyes, S. G. B. 2001. *Magic Bullets, Lost Horizons: the Rise and Fall of Antibiotics.* Taylor and Francis, New York, N.Y.
Anborgh, P. H., and A. Parmeggiani. 1991. New antibiotic that acts specifically on The GTP-bound form of elongation factor Tu. *EMBO J.* **10:**779-784.
Andres, C. J., J. J. Bronson, S. V. D'Andrea, M. S. Deshpande, P. J. Falk, K. A. Grant – Young, W. E. Harte, H. T. Ho, P. F. Misco, J. G. Robertson, D. Stock, Y. Sun, and A. W. Walsh. 2000. 4-Thiozolidinones: novel inhibitors of the bacterial enzyme MurB. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10:**715-717.
Anonymous. 1999. The choice of antibacterial drugs. *Med. Lett.* **41:**95-104.
Anonymous. 2001. The choice of antibacterial drugs. *Med. Lett.* **43:**69-78.
Apfel, C. M., H. Locher, S. Evers, B. Takacs, C. Hubschwerlen, W. Pirson, M. G. Page, and W. Keck. 2001. Peptide deformylase as an antibacterial drug target: target validation and resistance development. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1058-1064.
Araoz, R., E. Anhalt, L. Rene, M. A. Badet-Denisot, P. Courvalin, and B. Badet. 2000. Mechanism-based inactivation of VanX, a D-alanyl-D-alnine dipeptidase necessary for vancomycin resistance. **Biochemistry 39:**15971-15979.
Arthur, M., and P. Courvalin. 1993. Genetics and mechanism of glycopeptides resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37:**1563-1571.
Arya, P., D. T. H. Chou, and M. G. Baek. 2001. Diversity-based organic synthesis in the era of genomics and proteomics. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:339-346.
Arya, P., R. Joseph, and D. T. Chou. 2002. Toward high-throuhput synthesis of complex natural product-like compound in the genomic and proteomics age. *Chem. Biol.* **9:**145-156.
Asahi, Y., Y. Takeuchi, and K. Ubukata. 1999. Diversity of substitutions within

Or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in Cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumonia* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**1252-1255.
Bachmann, B. O., R. Li, and C. A. Townsend. 1998. *β*-lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95:**9082-9086.
Baizman, E. R., A. A. Branstrom, C. B. Longley, N. Allanson, M. J. Sofia, D. Gange, and R. C. Goldman. 2000. Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology* **146**(Pt. 12):3129-3140.
Baltz, R. H. 1997. Lipopeptide antibiotics produced by *Streptomyces roseosporus* and *Streptomyces fradiae,* p. 415-430. In W. R. Strohl (ed.), *Biotechnology of Antibiotics,* 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
Ban, C., and W. Yang. 1998. Crystal structure and ATPase activity of MutL: implication for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95:**541-552.
Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution. *Science* **289:**٩٠٥- ٩٢٠.
Barrett, J. F., and J. A. Hoch. 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:**1529-1536.
Barrier, J. C., N. Berthaud, D. Beyer, S. Dutka-Malen, J. M. Paris, and J. F. Desnottes. 1998. Recent developments in streptogramin research. *Curr. Pharm. Des.* **4:**155-180.
Barton, D., Sir K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, and U. Sankawa. 1999. *Comprehensive Natural Products Chemistry.* Pergamon, New York, N.Y.
Bayles, K. W. 2000. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol.* **8:**274-278.
Beadle, B. M., I. Trehan, P. J. Focia, and B. K. Shoichet. 2002. Structural milestones in the reaction pathway of an amide hydrolase: substrate, acyl, and product complexes of cephalothin with AmpC beta-lactamase. *Structure* (Cambridge) **10:**413-424.
Belova, L. T. Tenson, L. Xiong, P. M. McNicholas, and A. S. Mankin. 2001. A novel site of antibiotic action in the ribosome: interaction of everninomicin with the large ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98:**3726-3731.
Benson, T. E., D. J. Filman, C. T. Walsh, and J. M. Hogle. 1995. An enzyme-substrate complex involved in bacterial cell wall biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **2:**644-653.
Benson, T. E., J. L. Marquardt, A. C. Marquardt, F. A. Etzkorn, and C. T. Walsh. 1993. overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-*N*-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. Biochemistry **32:**2024-2030.
Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabbinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D.Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Hopwood. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor A3* (2). *Nature* **417:**141-147.
Berger, J. M., S. J. Gamblin, S. C. Harrison, and J. C. Wang. 1996. Structure and

mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **379:**225-232.
Berger-Bachi, B., and M. Tschierske. 1998. Role of Fem factors in methicillin resistance. *Drug Resist. Update* **2:**310-324.
Bernat, B. A., L. T. Laughlin, and R. N. Armstrong. 1997. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry* **36:**3050-3055.
Besra, G. S., K. H. Khoo, M. R. McNeil, A. Dell, H. R. Morris, and P. J. Brennan. 1995. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34:**4257-4266.
Bibb, M. 1996. 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142:** (Pt. 6): 1335-1344.
Bibb, M. J., V. Molle, and M. J. Buttner. 2000. Sigma (BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase Sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **182:**4606-4616.
Bischoff, D., S. Pelzer, A. Holtzel, G. J. Nicholson, S. Stockert, W. Wohlleben, G. Jung, and R. D. Sussmuth. 2001. The biosynthesis of vancomycin-type glycopeptide antibiotics – new insights into the cyclization steps. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40:**1693-1696.
Bonhoeffer, S., M. Lipsitch, and B. R. Levin. 1997. Evaluating treatment protocols to prevent antibiotic resistance. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **94:**12106-12111.
Borges-Walmsley, M. I., and A. R. Walmsley. 2001. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol.* **9:**71-79.
Borisova, S. A., L. Zhao, D. H. Sherman, and H. W. Liu. 1999. Biosynthesis of desosamine: construction of a new macrolide carrying a genetically designed sugar moiety. *Org. Lett.* **1:**133-136.
Born, T. L., and J. S. Blanchard. 1999. Structure/ function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Boil.* **3:**607-613.
Bozdogan, B., and R. Leclercq. 1999. Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium. Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**2720-2725.
Braun, V., and K. Hantke. 1974. Biochemistry of bacterial cell envelopes. *Annu. Rev. Biochem.* **43:**89-121.
Breukink, E., I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. Sahl, and B. de Kruijff. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **286:**2361-2364.
Briggs, C. E., and P. M. Fratamico. 1999. Molecular characterization of an antibiotic Resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.***43:**846-849.
Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker. 1994. *Biology of Microorganisms,* 7th ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J.
Brodersen, D. E., W. M. Clemmons, A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit.

Cell **103:**1143-1154.
Bronson, J. J., and J. F. Barrett. 2001a. recent developments in antibacterial research. *Annu. Rep. med. Chem.* **36:**89-98.
Bronson, J. J., and J. F. Barrett. 2001b. Quinolone, everninomycin, glycycline, carbapenem, lipopeptide and cephem antibacterials in clinical development. *Curr. Med. Chem.* **8:**1775-1793.
Brotz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds, and H. G. Sahl. 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:**154-160.
Brotz, H., and H. G. Sahl. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target. *J. Antimicrob. Chemother.* **46:**1-6
Bugg, T. D., G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh. 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* **30:**10408-10415.
Bugg, T. D., and C. T. Walsh. 1992. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat. Prod. Rep.* **9:**199-215.
Bugg, T. D., and P. E. Brandish. 1994. From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **119:** 255-262.
Bush, K., and S. Mobashery. 1998. How beta-lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention. *Adv. Exp. Med. Boil.* **456:**71-98.
Bush, K., and M. Macielag. 2000. New approaches in the treatment of bacterial infections. *Curr. Opin. Chem.. Boil.* **4:**433-439.
Bussiere, D. E., S. W. Muchmore, C. G. Dealwis, G. Schluckebier, V. L. Nienaber, R. P. Edalji, K. A. Walter, U. S. Ladror, T. F. Holzman, and C. Abad-Zapatero. 1998. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* **37:**103-7112.
Bycroft, B. W., C. Maslen, S. J. Box, A. Brown, and J. W. Tyler. 1988. The biosynthetic implications of acetate and glutamate incorporation into (3R,5R)-carbapenam-3carboxylic acid and (5R)-carbapen-2-em-3-carboxylic acid by *Serratia sp. J. Antibiot.* (Tokyo) **41:**1231-1242.
Calfee, M. W., J. P. Colemen, and E. C. Pesci. 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. acad. Sci.* USA **98:**11633-11637.
Campbell, E. A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, and S. A. Darst. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* **104:**901-912.
Capobianco, J. O., Z. Cao, V. D. Shortridge, Z. Ma, R. K. Flamm, and P. Zhong. 2000. Studies of the novel ketolide ABT-773: transfort, binding to ribosomes, and inhibition of protein synthesis in *Streptococcus pneumonia. Antimicrob. Agents Chemother.* **44:**1562-1567.

Carter, A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407:**340-348.

Cassidy, P. J., and F. M. Kahan. 1973. A stable enzyme-phosphoenolpyruvate intermediate in the synthesis of uridine-5'-diphospho-N-acetyl-2-amino-2-deoxy-glucose 3-O-enolpyruvyl ether. *Biochemistry* **12:**1364-1374.

Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbial. Rev.* **13:**686-707.

Chakraburtty, R., and M. Bibb. 1997. The ppGpp synthetase gene (relA) of *Streptomyces coelicolor A3* (2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179:**5854-5861.

Champness, W. C. 2000. *Prokaryotic Development.* ASM Press, Washington, D. C.

Chang, G., and C. B. Roth. 2001. Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293:**1793-1800.

Chang, H. M., M. Y. Chen, Y. T. Shieh, M. J. Bibb, and C. W. Chen. 1996. The cutRS signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol. Microbial.* **21:**1075-1085.

Chang, Y. T., N. S. Gray, G. R. Rosania, D. P. Sutherlin, S. Kwon, T. C. Norman, R. Sarohia, M. Leost, L. Meijer, and P. G. Schultz. 1999. Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Boil.* 6:361-375.

Chen, H., M. G. Thomas, B. K. Hubbard, H. C. Losey, C. T. Walsh, and M. D. Burkart. 2000. Deoxysugars in glycopeptides antibiotics: enzymatic synthesis of TDP-*L*-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:** 11942-11947.

Chen, H., and C. T. Walsh. 2001. Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: beta-hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem. Boil.* **8:**301-312.

Chen, X., S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorsselaer, I. Pelczer, B. L. Bassler, and F. M. Hughson. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415:**545-549.

Chirgadze, N. Y., S. L. Briggs, K. A. McAllister, A. S. Fischl, and G. Zhao. 2000. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* acyl carrier protein synthase: an essential enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis. *EMBO J.* **19:**5281-5287.

Chopra, I., J. Hodgson, B. Metcalf, and G. Poste. 1997. The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41:**497-503.

Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbial. Mol. Boil. Rev.* **65:**232-260.

Chu, D. T. 1999. Recent progress on novel macrolides, quinolones, and 2-pyridones to overcome bacterial resistance. *Med. Res. Rev.* **19:**497-520.

Chu, D. T., J. J. Plattner, and L. Katz. 1996. New directions in antibacterial research. *J. Med. Chem.* **39:**3853-3874.

Chuanchuen, R., K. Beinlich, T. T. Hoang, A. Becher, R. R. Karkhoff-Schweizer,

and H. P. Schweizer. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**428-432.

Clements, J. M., F. Coignard, I Johnson, S. Chander, S. Palan, A. Waller, J. Wijk-mans, and M. G. Hunter. 2002. Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46:**1793-1799.

Cockerill, F. R., III. 1999. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**199-212.

Cohen, M. L. 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406:**762-767.

Coote, J. G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **8:**137-161.

Cortes, J., S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, and P. F. Leadlay. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing poly-ketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea. Nature* **348:**176-178.

Couturier, M., M. el Bahassi, and L. Van Melderen. 1998. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends Microbiol.* **6:**269-275.

Cozzarelli, N. R. 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207:**953-960.

Crump, M. P., J. Crosby, C. E. Dempsey, J. A. Parkinson, M. Murray, D. A. Hopwood, and T. J. Simpson. 1997. Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor A3*(2). *Biochemistry* **36:**6000-6008.

Cubbon, M. D., and R. G. Masterton. 2000. New quinolones — a fresh answer to the pneumococcus. *J. Antimicrob. Chemother.* **46:**869-872.

Cudic, M., and L. Otvos, Jr. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets* **3:**101-106.

Cudic, P., J. K. Kranz, D. C. Behenna, R. G. Kruger, H. Tadesse, A. J. Wand, Y. I. Veklich, J. W. Weisel, and D. G. McCafferty. 2002. Complexation of peptidoglycan intermediates by the lipoglycodepsipeptide antibiotic ramoplanin: minimal structural requirements for intermolecular complexation and fibril formation. *Proc. Natl. acad. Sci.* USA **99:**7384-7389.

Culver, G. M. 2001. Meanderings of the mRNA through the ribosome. *Structure* (Cambridge) **9:**751-758.

Dancer, S. J. 2001. The problem with cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **48:**463-478.

Datta, N., and P. Kontomichalou. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* **208:**239-41.

Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264:**375-382.

Davis, J. R. Lederberg. 2000. NAS *Workshop Report: Emerging Infectious Diseases from the Global to the Local Perspective.* National Academy of Sciences, Washington, D. C.

Decicco, C. P., D. J. Nelson, Y. Luo, L. Shen, K. Y. Horiuchi, K. M. Amsler, L. A. Foster, S. M. Spitz, J. J. Merrill, C. F. Sizemore, K. C. Rogers, R. A. Copeland, and M. R. Harpel. 2001. Glutamyl-gamma-boronate inhibitors of bacterial GlutRNA (Gln(amidotransferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2561-2564.

Denome, S. A., P. K. Elf, T. A. Henderson, D. E. Nelson, and K. D. Young. 1999. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* **181:**3981-3993.

DeVito, J. A., J. A. Mills, V. G. Liu, A. Agarwal, C. F. Sizemore, Z. Yao, D. M. Stoughton, M. G. Cappiello, M. D. Barbosa, L. A. Foster, and D. L. pompliano. 2002. An array of target-specific screening strains for antibacterial discovery. *Nat. Biotechnol.* **20:**478-483.

Diederichs, K., J. Diez, G. Greller, C. Muller, J. Breed, C. Schell, C. Vonrhein, W. Boos, and W. Welte. 2000. Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon Thermococcus litoralis. *EMBO J.* **19:**5951-5961.

Dinos, G. P., and D. L. Kalpaxis. 2000. Kinetic studies on the interaction between a ribosomal complex active in peptide bond formation and the macrolide antibiotics tylosin and erythromycin. *Biochemistry* **39:**11621-11628.

Doekel, S., and M. A. Marahiel. 2001. Biosynthesis of natural products on modular peptide synthesis. *Metab. Eng.* **3:**64:-77

Dolle, R. E. 2000. Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1999. *J. Comb. Chem.* **2:**383-433.

Donadio, S., M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson, and L. Katz. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252:**675-679.

Dong, Y. H., J. L. Xu, X. Z. Li, and L. H. Zhang. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora. Proc. Natl. acad. Sci. USA* **97:**3526-3531.

Dougherty, T. J., K. Kennedy, R. E. Kessler, and M. J. Pucci. 1996. Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **178:**110-6115.

Douthwaite, S., L. H. Hansen, and P. Mauvais. 2000. Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Mol. Microbiol.*
36:183-193.

Drunkard, E., and F. M. Ausubel. 2002. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416:**740-743.

Drlica, K, 2001. Antibiotic resistance: can we beat the bugs? *Drug Discov. Today* **6:**714-715.

Du, L., C. Sanchez, and B. Shen. 2001. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab. Eng.* **3:**78-95.

Duitman, E. H., L. W. Hamoen, M. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Bernhard, R. Reinhards, M. Schmidt, C. T. Stein, F. Leenders, and J. Vater. 1999. The mycosubtilin synthesis of Bacillus subtilis ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:**13294-13299.

Eggert, U. S., N. Ruiz, B. V. Falcone, A. A. Branstrom, R. C. Goldman, T. J. Silhavy, and D. Kahne. 2001. Genetic basis for activity differences between vancomycin and glycolopid derivatives of vancomycin. *Science* **294:**361-364.

Elliot, T. S., J. G. M. Hastings, and U. Desselberger. 1997. *Lecture Notes on Medical Microbiology,* 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, United Kingdom.
Engberg, J., F. M. Aarestrup, D. E. Taylor, P. Gerner-Smidt, and I. nachamkin. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli:* resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:24-34.
Enne, V. I., D. M. Livermore, P. Stephens, and L. M. Hall. 2001. Persistence of sulphonamide resistance in Escherichia coli in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* **357:**1325-1328.
Erlandsen, H., E. E. Abola, and R. C. Stevens. 2000. Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. *Curr. Opin. Struct. Boil.* **10:**719-730.
Falkows, S., and D. Kennedy. 2000. Antibiotics, animals, and people-again! *Science* **291:**397.
Fan, C., P. C. Moews, C. T. Walsh, and J. R. Knox. 1994. Vancomycin resistance: structure of D-alanine:D-alanine ligase at 2.3 A resolution. *Science* **266:**439-443.
Fernandez-Lopez, S., H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuenhl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxen, and M. R. Ghadiri. 2001. Antibacterial agents based on the cyclic *D*,L-alpha-peptide architecture. *Nature* **412:**452-455.
Fierro, J. F., C. Hardisson, and J. A. Salas. 1987. Resistance to oleandomycin in *Streptomyces antibioticus,* the producer organism. *J. Gen. Microbiol.* **133**(Pt. 7):1931-1939.
Filipe, S. R., M. G. Pinho, and A. Tomasz. 2000. Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in *Streptococcus pneumonia. J. Biol. Chem.* **275:**27768-27774.
Fisher, J., J. G. Belasco, S. Khosla, and J. R. Knowles. 1980. β-lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of the Escherichia coli RTEM enzyme with cefoxitin. *Biochemistry*
19:2895-2901.
Fralick, J. A. 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **178:**5803-5805.
Fuchs, P. C., A. L. Barry, and S. D. Brown. 2001. In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against clinical bacterial isolates from 11 Norht American medical centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**1915-1918.
Fujihashi, M., Y. W. Zhang, Y. Higuchi, X. Y. Li, T. Koyama, and K. Miki. 2001. Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98:**4337-4342.
Galan, J. E., and A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284:**1322-1328.
Gale, E. F., E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, and M. J. Waring. 1981. *The Molecular Basis of Antibiotic Action,* 2nd ed. Wiley, London, United Kingdom.
Garrett, L. 1995. *The Coming Plague: Newly Emerging Diseases in a World out of Balance.* Virago, London, United Kingdom.
Gaunt, P. N., and L. J. Piddock. 1996. Ciprofloxacin *resistant Campylobacter* spp. In humans: an epidemiological and laboratory study. *J. Antimicrob. Chemother.* **37:**747-757.

Ge, M., Z. Chen, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson, and D. Kahne. 1999. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala. *Science* **284:**507-511.

Gegnas, L. D., S. T. Waddell, R. M. Chabin, S. Reddy, and K. K. Wong. 1998. Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8:**1643-1618.

Gehring, A. M., W. J. Lees, D. J. Mindiola, C. T. Walsh, and E. D. Brown. 1996. Acetyltransfer precedes uridylyltransfer in the formation of UDP-N-acetylglucosamine in separable active sites of the bifunctional GlmU protein of *Escherichia coli. Biochemistry* **35:**579-585.

Ghuysen, J. M. 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45:**37-67.

Gokhale, R. S., S. Y. Tsuji, D. E. Cane, and C. Khosla. 1999. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **284:**482-485.

Goldman, R. C., S. W. Fesik, and C. C. Doran. 1990. Role of protonated and neutral forms of macrolides in binding to ribosomes from gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34:**426-431.

Gorbach, S. L. 2001. Antimicrobial use in animal feed—time to stop. N. *Eng. J. Med.* **345:**1202-1203.

Gould, I. M. 1999. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **43:**459-465.

Goussard, S., and P. Courvalin. 1999. Updated sequence information for TEM beta-lactamase genes. *Antimicrob. Chemother.* **43:**367-370.

Greenwood, D., and F. O'Grady. 1969. A comparison of the effects of ampicillin on Escherichia coli and Proteus mirabilis. *J. Med. Microbiol.* **2:**435-441.

Greenwood, D. 2000. *Antimicrobial Chemotherapy*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Greenwood, D., and F. O'Grady. 1973. The two sites of penicillin action in Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* **128:**791-794.

Groisman, E. A. 2001. *Principles of Bacterial Pathogenesis.* Academic Press Inc., San Diego, Calif.

Guan, K. L., and J. E. Dixon. 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia, *Science* **249:**553-556.

Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, and S. I. Miller. 1997. Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. *Science* **276:**250-253.

Guo, L., K. B. Lim, C. M. Poduje, M. Daniel, J. S. Gunn, M. Hackett, and S. I. Miller. 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95:**189-198.

Ha, S., E. Chang, M-C. Lo., H. Men, P. Park, M. Ge, and S. Walker. 1999. The kinetic characterization of *Escherichia coli* MurG using synthetic substrate analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **121:**8415-8426.

Ha, S., D. Walker, Y. Shi, and S. Walker. 2000. The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci.*
9:1045-1052.

Hakenbeck, R. 1998. Mosaic genes and their role in penicillin-resistant *Streptococcus pneumonia. Electrophoresis* **19:**597-601.

Hakenbeck, R., T. Grebe, D. Zahner, and J. B. Stock. 1999. Beta-lactam resistance in *Sterptococcus pneumonia:* penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **33:**673-678.

Hall, D. G., S. Manku, and F. Wang. 2001. Solution-and solid-phase strategies for the design, synthesis, and screening of libraries based on natural product templates: a comprehensive survey. *J. Comb. Chem.* **3:**125-150.

Hancock, R. E., and D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**1317-1323.

Hansen, J. N. 1997. Nisin and related antimicrobial peptides, p. 437-470. *In* W. R. Strohl (ed.), Biotechnology of Antibiotics, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Hansen, J. L., J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2002. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* **10:**117-128.

Hanzelka, B. L., M. R. Parsek, D. L. Val, P. V. Dunlap, J. E. Cronan, Jr., and E. P. Greenberg. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* **181:**5766-5770.

Hecht, S., W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. kis, A. bacher, D. Arigoni, and F. Rohdich. 2001. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98:**14837-14842.

Heddle, J. G., S. J. Blance, D. B. Zamble, F. Hollfelder, D. A. Miller, L. M. Wentzell, C. T. Walsh,
and A. Maxwll. 2001. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterization of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* **307:**1223-1234.

Hedl, M., A. Sutherlin, E. I. Wilding, M. Mazzulla, D. McDevitt, P. Lane, J. W. Burgner, 2nd K. R. Lehnbeuter, C. V. Stauffacher, M. N. Gwynn, and V. W. Rodwell. 2002. *Enterococcus faecalis* acetoacetyl-coenzyme A thiolase/ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, a dual-function protein of esopentenyl diphosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **184:**2116-2122.

Heep, M., U. Rieger, D. Beck, and N. Lehn. 2000. Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* **44:**1075-1077.

Heerding, D. A., G. Chan, W. E. DeWolf, A. P. Fosberry, C. A. Janson, D. D. Jaworski, E. McManus, W. H. Miller, T. D. Moore, D. J. Payne, X. Qiu, S. F. Rittenhouse, C. Slater-Radosti, W. Smith, D. T. Takata, K. S. Vaidya, C. C. Yuan, and W. F. Huffman. 2001. 1,4-Disubstituted imidazoles are potential antibacterial agents functioning as inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11:**2061-2065.

Heffron, S. E., and F. Jurnak. 2000. Structure of an EF-Tu complex with a thiazolyl peptide determined at 2.35 Å resolution: atomic basis for GE2270A inhibition of EF-Tu. *Biochemistry* **39:**37-45.

Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269:**400-403.

Hilliard, J. J., R. M. Goldschmidt, L. Licata, E. Z. Baum, and K. Bush. 1999. Multiple mechanisms of action for inhibitors of histidine kinases from bacterial two component systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43:**1693-1699.
Hiramatsu, K. 1998. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am. J. Med.* 104:7S-10S.
Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Trends Microbiol.* **9:**486-493.
Holdgate, G. A., A. Tunnicliffe, W. H. Wards S. A. Weston, G. Rosenbrock, P. T. Barth, I, W. Taylor, R. A. Pauptit, and D. Timms. 1997. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* **36:**9663-9673.
Holtje, J. V. 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli. Microbial. Mol. Biol. Rev.* **62:**181-202.
Hon, W. C., G. A. McKay, P. R. Thompson, R. M. Sweet, D. S. Yang, G. D. Wright, and A. M Berghuis. 1997. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell* **89:**887-895.
Hopwood, D. A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem. Rev.*
97:2465-2498.
Hu, H., Q. Zhang, and K. Ochi. 2002. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the rpoB gene (encoding the RNA polymerase beta subunit) of *Streptomyces lividans. J. Bacteriol.*
184:3984-3991.
Hubbard, B. K., M. G. Thomas, and C. T. Walsh. 2000. Biosynthesis of L-p-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **7:**931-942.
Hubbard, B. K., and C. T. Walsh. Vancomycin assembly; Nature's way. *Angew. Chem. Int.*
Ed. Engl., in press.
Hughes, J. M., and F. C. Tenover. 1997. Approaches to limiting emergence of antimicrobial resistance in bacteria in human populations. *Clin. Infect. Dis.* **24**(Suppl.1): S131-S135.
Hung, L. W., I. X. Wang, K. Nikaido, P. Q. Liu, G. F. Ames, and S. H. Kim. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396:**703-707.
Huntington, K. M., T. Yi, Y. Wei, and D. Pei. 2000. Synthesis and antibacterial activity of peptide deformylase inhibitors. *Biochemistry* **39:**4543-4551.
Hutchinson, C. R. 1997. Antibiotics from genetically engineered microorganisms, p.683-702. In W. R. Strohl (ed.), *Biotechnology of Antibiotics,* 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
Hutchinson, C. R., and I. Fujii. 1995. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **49:**201-238.
Ilangovan, U., H. Ton-That, J. Iwahara, O. Schneewind, and R. T. Clubb. 2001. Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98:**6056-6061.

Isberg, R. R., and J. M. Leong. 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasion, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60:**861-871.

Jack, R., G. Bierbaum, C. Heidrich, and H. G. Sahl. 1995. The genetics of lantibiotic biosynthensis. *Bioassays* **17:**793-802.

Jackman, J. E., C. R. Raetz, and C. A. Fierke. 1999. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucusamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* **38:**1902-1911.

Jacobs, C., J. M. Frere, and S. Normark. 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88:**823-832.

Jain, R., M. C. Rivera, and J. A. lake. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:**3801-3806.

Jarvest, R. L., J. M. Berge, C. S. Houge-Frydrych, L. M. Mensah, P. J. O'Hanlon, and A. J. Pope. 2001. Inhibitors of bacterial tyrosyl tRNA synthetase: synthesis of carbocyclic analogues of the natural product SB-219383. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11:**2499-2502.

Ji, Y., B. Zhang, S. F. Van Horn, P. Warren, G. Woodnutt, M. K. Burnham, and M. Rosenberg. 2001. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* **293:**2266-2269.

Jiang, W., J. Wanner, R. J. Lee, P. Y. Bounaud, and D. L. Boger. 2002. Total synthesis of the ramoplanin A2 and ramoplanose aglycon. *J. Am. Chem. Soc.* **124:**5288-5290.

Kahan, J. S., F. M. Kahan, R. Goegelman, S. A. Currie, M. Jackson, E. O. Stapley, T. W. Miller, A. K. Miller, D. Hendlin, S. Mochales, S. Hernandez< H. B. Woodruff, and J. Birnbaum. 1979. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I.. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J. Antibiot.* (Tokyo) **32:**1-12.

Kaper, J. B., and A. D. O'Brien. 1998. Escherichia coli O157:H7 *and other Shiga toxin-producing E. coli strains.* ASM Press, Washington, D.C.

Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli. Clin. Microbial. Rev.* **2:**15-38.

Katz, L. 1997. Manipulation of modular polyketide synthases. *Chem.. Rev.* **97:**2557-2576.

Kawachi, R., U. Wangchaisoonthorn, T. Nihira, and Y. Yamada. 2000. Identification by gene deletion analysis of a regulate. VmsR, that controls virginiamycin biosynthesis in *Streptomyces virginiae. J. Bacteriol.* **182:**6259-6263.

Keating, T. A., and C. T. Walsh. 1999. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3:**598-606.

Kemp, L. E., C. S. Bond, and W. N. Hunter. 2002. Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: an essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99:**6591-6596.

Khaleeli, n., R. W. Busby, and C. A. Townsend. 2000. Site-directed mutagenesis and biochemical analysis of the endogenous ligands in the ferrous active site of clavaminate synthase: the His-3 variant of the 2_His-1-carboxylate mold. *Biochemistry* **39:**8666-8673.

Khosla, C. 1997. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases. *Chem.. Rev.* **97:**2577-2590.

Kieser, T., K. F. Chater, M. Bibb, M. J. Buttner, and D. A. Hopwood. 2000. *Practical* Streptomyces *Genetics.* The John Innes Foundation, Norwich.

Kinoshita, K., P. G. Willard, C. Khosla, and D. E. Cane. 2001. Precursor-directed biosynthesis of 16-membered macrolides by the erythromycin polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **123:**2495-2502.

Kleerebezem, M., L. E. Quadri, O. P. Kuipers, and W. M. de Vos. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **24:**895-904.

Kloss, P., L. Xiong, D. L. Shinabarger, and A. S. Mankin. 1999. Resistance mutations in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol.* **294:**93-101.

Knowles, J. R. 1985. Penicillin resistance: the chemistry of β-lactamase inhibition. *Acc. Chem. Res.* **18:**97-104.

Knox, J. R. 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamase: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39:**2593-2601.

Knox, J. R., P. C. Moews, and J. M. Frere. 1996. Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem. Boil.* **3:**937-947.

Kobayashi, K., M. Ogura, H. Yamaguchi, K. Yoshida, N. Ogasawara, T. Tanaka, and Y. Fujita.
2001. Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems.
J. Bacteriol. **183:**7365-7370.

Koebnik, R., K. P. Locher, and P. Van Gelder. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37:**239-253.

Konz, D., and M. A. Marahiel. 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.* **6:**R39-R48.

Koppisch, A. T., D. T. Fox, B. S. Blagg, and C. D. Poulter. 2002. E. coli MEP synthase: steady-state kinetic analysis and substrate binding. *Biochemistry* **41:**236-243.

Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405:**914-919.

Kostrewa, D., A. D'Arcy, B. Takacs, and M. Kamber. 2001. Crystal structures of *Streptococcus pneumonia* N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, GlmU, in apo form at 2.33 Å resolution and in complex with UDP-N-acetylglucusamine and Mg(2+) at 1.96 Å resolution. *J. Mol. Biol.*
305:279-289.

Kotra, L. P., J. Haddad, and S. Mobashery. 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44:**3249-3256.

Kragol, G., S. Lovas, G. Varadi, B. A. Condie, R. Hoffmann, and L. Otvos, Jr. 2001. The antibacterial peptide pyrrhocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40:**3016-3026.

Kunin, C. M. 1997. Antibiotic Armageddon. *Clin. Infect. Dis.* **25:**240-241.

Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C.

Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T, Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Lancet* **357:**1225-1240.

Kurokawa, H., T. Yagi, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 1999. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* **354:**955.

Kurz, M., and W. Guba. 1996. 3D structure of ramoplanin: a potent inhibitor of bacterial cell wall synthesis. *Biochemistry* **35:**12570-12575.

Kurz, M., W. Guba, and L. Vertesy. 1998. Three-dimensional structure of moenomycin, a—a potent inhibitor of penicillin-binding protein 1b. *Eur. J. Biochem.* **252:**500-507.

Kuzin, A. P., T. Sun, J. jorczak-Baillass, V. L. Healy, C. T. Walsh, and J. R. Knox. 2000. Enzymes
of vancomycin resistance: the structure of D-alanine-D-lactate ligase of naturally resistant *Leuconostoc mesenteroides. Structure* **8:**463-470.

Lambalot, R. H., A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, and C. T. Walsh. 1996. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinlyl transferases. *Chem. Boil.* **3:**923-936.

Lancini, G. 1983. Ansamycins, p. 231-254. In L. C. Vining (ed.), *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics.* Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass.

Lee, D., J. K. Sello, and S. L. Schreiber. 1999. A strategy for macrocyclic ring closure and functionalization aimed toward split-pool syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **121:**10648-10649.

Lee, J., S. U. Kang, S. Y. Kim, S. E. Kim, Y. J. Job, and S. Kim. 2001. Vanilloid and isovanilloid analogues as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11:**965-968.

Lee, V. J., and S. J. Hecker. 1999. Antibiotic resistance versus small molecules, the chemical evolution. *Med. Res. Rev.* **19:**521-542.

Lee, V. T., and O. Schneewind. 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* **15:**1725-1752.

Lessard, I. A., V. L. Healy, I. S. Park, and C. T. Walsh. 1999. Determinants for diffential effects on D-Ala-D-lactate vs D-Ala-D-Ala formation by the VanA ligase from vancomycin-resistant enterococci. *Biochemistry* **38:**14006-14022.

Lessard, I. A., and C. T. Walsh. 1999. Mutational analysis of active-site residues of the enterococcal D-Ala-D-Ala dipeptidase VanX and comparison with Escherichia coli D-Ala-D-Ala ligase and D-Ala-D-Ala carboxypeptidase VanY. *Chem.. Biol.* **6:**177-187.

Levy, S. B. 1992. *The Antibiotic Paradox: How Miracle Drugs are Destroying the Miracle.* Plenum Press, New York, N.Y.

Levy, S. B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.* **278:**46-53.

Levy, S. B. 2001. Antimicrobial resistance potential. *Lancet* **358:**1100-1101.

Lewis, H. A., E. B. Furlong, B. Laubert, G. A. Eroshkina, Y. Batiyenko, J. M. Adams, M. G. Bergseid, C. D. Marsh, T. S. Peat, W. E. Sanderson, J. M. Sauder, and S. G. Buchanan. 2001. A structural genomics approach to the study of quorum sensing: crystal structures of three LuxS orthologs. *Structure* **9:**527-537.

Lewis, R. J., O. M. Singh, C. V. Smith, T. Skarzynski, A. Maxwell, A. J. Wonacott, and D. B. Wigley. 1996. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* **15:**1412-1420.
Li, R., N. Khaleeli, and C. A. Townsend. 2000. Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic
acid by *Streptomyces clavuligerus. J. Bacteriol.* **182:**4087-4095.
Lim, D., H. U. Park, L. De Castro, S. G. Kang, H. S. Lee, S. Jensen, K. J. Lee, and N. C. Strynadka. 2001. Crystal structure and kinetic analysis of beta-lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1 beta-lactamase. *Nat. Struct. Biol.* **8:**848-852.
Lindsley, C. W., L. K. Chan, B. C. Goess, R. Joseph, and M. D. Shair. 2000. Solid phase biomimetic synthesis of carpanone-like molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **122:**422-423.
Liu, H., R. Sadamoto, P. S. Sears, and C. H. Wong. 2001. An efficient chemo-enzymatic strategy for the synthesis of wild-type and vancomycin-resistant bacterial cell-wall precursors: UDP-N-acetylmuramyl-peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **123:**9916-9917.
Liu, H. W., and J. S. Thorson. 1994. Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **48:**223-256.
Livermore, D. M. 2000. Quinupristin/dalfopristin and linezolid: where, when, which and whether to use? *J. Antimicrob. Chemother.* **46:**347-350.
Livermore, D. M., and N. Woodford. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* **3:**489-495.
Lo, M.-C., H. Men, A. Branstrom, J. Helm, N. Yao, R. Goldman, and S. Walker. 2000. A new mechanism of action proposed for ramoplanin. *J. Am. Chem. Soc.* **122:**3540-3541.
Locher, K. P., A. T. Lee, and D. C. Rees. 2002. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296:**1091-1098.
Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, and V. J. Lee. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**105-116.
Lorenz, M. C., and G. R. Fink. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412:**83-86.
Lorian, V., and F. Fernandes. 1997. The effect of vancomycin on the structure of vancomycin-susceptible and resistant Enterococcus faecium strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41:**1410-1411.
Losey, H. C., M. W. Peczuh, Z. Chen, U. S. Eggert, S. D. Dong, I. Pelczer, D. Kahne, and C. T. Walsh. 2001. Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: novel glycopeptides. *Biochemistry* **40:**4745-4755.
Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339:**520-532.
Lyon, G. J., P. Mayville, T. W. Muir, and R. P. Novick. 2000. Rational design of a global inhibitor of the site of the virulence response in *Staphylococcus aureus,* based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:**13330-13335.
Ma, Y., F. Pan, and M. McNeil. 2002. Formation of dTDP-rhamnose is essential for growth of mycobacteria. *J. Bacteriol.* **184:**3392-3395.

Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259:**686-688.
Mahan, M. J., J. W. Tobias, J. M. Slauch, P. C. Hanna, R. J. Collier, and J. J. Mekalanos. 1995. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **92:**669-673.
Maiti, S. N., O. A. Phillips, R. G. Micetich, and D. M. Livermore. 1998. Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. *Curr. Med. Chem.* **5:**441-456.
Malik, V. S. 1972. Chloramphenicol. *Adv. Appl. Microbial.* **15:**297-336.
Manges, A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug resistant *Escherichia coli* clonal group. *N. Engl. J. Med.* **345:**1007-1013.
Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97:**2651-2674.
Marmor, S., C. P. Petersen, F. Reck, W. Yang, N. Gao, and S. L. Fisher. 2001. Biochemical characterization of a phosphinate inhibitor of Escherichia coli MurC. *Biochemistry* **40:**12207-12214.
Marshall, C. G., G. Broadhead, B. K. Leskiw, and G. D. Wright. 1997. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptides antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VaA and VanB. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **94:**6480-6483.
Marshall, C. G., I. A. Lessard, I. Park, and G. D. Wright. 1998. Glycopeptides antibiotic resistance genes in glycopeptides-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:**2215-2220.
Martinez, M. B., M. Flickenger, L. Higgins, T. Krick, and G. L. Nelsestuen. 2001. Reduced outer membrane permeability of Escherichia coli O157:H7: suggested role of modified outer membrane porins and theoretical function in resistance to antimicrobial agents. *Biochemistry* **40:**11965-11974.
Martinez-Hackert, E., S. Harlocker, M. Inouye, H. M. Berman, and A. M. Stock. 1996. Crystallization, X-ray studies, and site-directed crysteine mutagenesis of the DNA-binding domain of OmpR. *Protein Sci.* **5:**1429-1433.
Martinez-Hackert, E., and A. M. Stock. 1997. The DNA-binding domain of PmpR: crystal structure of a winged helix transcription factor. *Structure* **5:**109-124.
Massova, I., and S. Mobashery. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:**1-17.
Matsushita, M., and K. D. Janda. 2002. Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **10:**855-867.
Maxwell, A. 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5:**102-109.
Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind. 1999. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the wall. *Science* **285:**760-763.
Mazmanian, S. K., H. Ton-That, and O. Schneewind. 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. *Mol. Microbiol.* **40:**1049-1057.
McCafferty, D. G., P. Cudic, M. K. Yu, D. C. Behenna, and R. Kruger. 1999. Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Boil.* **3:**672-680.
McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scoot,

A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of Salmonella enteric serovar Typhimurium LT2. Nature **413:**852-856.

McDaniel, R., A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, and G. Ashley. 1999. Multiple genetic modigications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:**1846-1851.

McDevitt, D., and M. Rosenberg. 2001. Exploiting genomics to discover new antibiotics. *Trends microbial.* **9:**611-617.

McDonald, L. C., S. Rossiter, C. Mackinson, Y. Y. Wang, S. Johnson, M. Sullivan, R. Sokolow, E. DeBess, L. Gilbert, J. A. Benson, B. Hill, and F. J. Angulo. 2001. Quinupristin-dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* on chicken and in human stool specimens. *N. Engl. J. Med.* **345:**1155-1160.

McDowell, P., Z. Affas, C. Reynolds, M. T. Holden, S. J. Wood, S. Saint, A. Cockayne, P. J. Hill, C. E. Dodd, B. W. Bycroft, W. C. Chan, and P. Williams. 2001. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus. Mol. Microbial.* **41:**503-512.

McGowan, J. E., Jr., and F. C. Tenover. 1997. Control of antimicrobial resistance in the health care system. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **11:**297-311.

McKinney, J. D., K. Honer zu Bentrup, E. J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W. T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchettini, W. R. Jacobs, Jr., and D. G. Russell. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406:**735-738.

McKinney, T. K., V. K. Sharma, W. A. Craig, and G. L. Archer. 2001. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus (mecA)* is co-repressed but not coinduced by cognate mecA and beta-lactamase regulators. *J. Bacretiol.* **183:**6862-6868.

McMahon, G., L. Su, C. Liang, and C. Tang. 1998. Protein kinase inhibitors: structure determinants for target specificity. *Curr. Opin. Drug. Discov.* **1:**131-146.

McMurry, L. M., M. Oethinger, and S. B. Levy. 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **394:**531-532.

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5:**607-625.

Men, H., P. Park, M. Ge, and S. Walker. 1998. Substrate synthesis and activity assay for MurG. *J. Am. Chem. Soc.* **120:**2484-2485.

Mengin-Lecreulx, D., and J. van Heijenoort. 1994. Co purification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltranferase activities of *Escherichia coli:* characterization of the glum gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **176:**5788-5795.

Miller,D. A., L. Luo, N. Hillson, T. A. Keating, and C. T. Walsh. 2002. Yersiniabactin synthetase. A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis. Chem. Boil.* **9:**333-344.

Miller, D. J., S. M. Hammond, D. Anderluzzi, and T. D. H. Bugg. 1998. Amino-alkyphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1:**131-142.

Miller, M. B., and B. L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbial.* **55:**165-199.

Miller, M. T., B. O. Bachmann, C. A. Townsend, and A. L. Rosenzweig. 2001. Structure of β-lactam synthetase reveals how to synthesize antibiotics instead of asparagines. *Nat. Struct. Boil.* **8:**684-689.

Mitcher, L. A., S. P. Pillai, E. J. Gentry, and D. M. Shankel. 1999. Multiple drug resistance. *Med. Res. Rev.* **19:**477-496.

Mittl, P. R., and M. G. Grutter. 2001. Structural genomics: opportunities and challenges. *Curr. Opin. Chem. Boil.* **5:**402-408.

Miyadoh, S., N. Tsuchizaki, J. Ishikawa, and K. Hotta. 1997. *Atlas of Actinomycetes.* Asakura Publishing Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Molbak, K., D. L. Baggesen, F. M. Aarestrup, J. M. Ebbesen, J. Engberg, K. Frydendahl, P. Gerner-Smidt, A. M. Petersen, and H. C. Wegener. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* **341:**1420-1425.

Murray, B. E. 2000. Problems and perils of vancomycin resistant enterococci. *Braz. J. Infect. Dis.* **4:**9-14.

Nagai, K., T. A. Davies, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 2002. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins(PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and –resistant pneumococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46:**1273-1280.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli. Clin. Microbial. Rev.* **11:**142-201.

Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbial. Mol. Boil. Rev.* **63:**174-229.

Navarro, F., and P. Courvalin. 1994. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus and Enterococcus flavescens. Antimicrob. Agents Chemother.* **38:**1788-1793.

Neuhaus, F. C., and W. P. Hammes. 1981. Inhibition of cell wall biosynthesis by analogues and alanine. *Pharmacol. Ther.* **14:**265-319.

Ng, E. Y., M. Trucksis, and D. C. Hooper. 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40:**1881-1888.

Nicholson, T. P., B. A. Rudd, M. Dawson, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, and R. J. Cox. 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. Biol.* **8:**157-178.

Nicolaou, K. C., J. A. Pfefferkorn, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, S. Barluenga, and H. J. Mitchell. 2000a. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1.
General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. *J. Am. Chem. Soc.* **122:**9939-9953.

Nicolaou, K. C., J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, and J. E. Lillig. 2000b. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 2. Construction of a 10,000-membered benzopyran library by directed split-and-pool chemistry using NanoKans and optical encoding. *J. Am. Chem. Soc.* **122:**9954-9967.

Nicolaou, K. C., J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, and G.-Q. Cao.
2000c. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 3.
The "libraries from libraries" principle for diversity enhancement of benzopyran libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **122:**9968-9976.

Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264:**382-388.

Nikaido, H. 1998. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin.*
Infect. Dis. **27:** (Suppl. 1):S32-S41.

Nishino, K., and A. Yamaguchi. 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **183:**5803-5812.

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289:**920-930.

Nouwen, N., N. Ranson, H. Saibil, B. Wolpensinger, A. Engel, A. Ghazi, and A. P. Pugsley. 1999. Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion conducting channel formation. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **96:**8173-8177.

Novak, R., E. Charpentier, J. S. Braun, and E. Tuomanen. 2000. Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol. Cell* **5:**49-57.

Novick, R. P. 1962. Staphylococcal penicillinase and new penicillins. *J. Bacteriol.* **83:**229-234.

Nyquist, A. C., R. Gonzales, J. F. Steiner, and M. A. Sande. 1998. Antibiotic prescribing for children with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis. *JAMA* **279:**875-877.

Onishi, H. R., B. A. Pelak, L. S. Gerckens, L. L. Silver, F. M. Kahan, M. H. Chen, A. A. Patchett, S. M. Galloway, S. A. Hyland, M. S. Anderson, and C. R. Raetz. 1996. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science* **274:**980-982.

Onodera, Y., Y. Uchida, M. Tanaka, and K. Sato. 1999. Dual inhibitory activity of sitafloxacin (DU-6859a) against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Streptococcus pneumonia. J. Antimicrob. Chemother.* **44:**533-536.

Orth, P., D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs. 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* **7:**215-219.

O'Sullivan, J., and C. Ball. 1983. *β*-lactams, p. 73-94. In L. C. vining (ed.), *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics.* Addison Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass.

Paik, J., I. Kern, R. Lurz, and R. Hakenbeck. 1999. Mutational analysis of the *Streptococcus pneumonia* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* **181:**3852-3856.

Pallen, M. J., A. C. Lam, M. Antonio, and K. Dunbar. 2001. An embarrassment of sortases—a richness of substrates? *Trends Microbiol.* **9:**97-102.

Palumbi, S. R. 2001. Humans as the worl's greatest evolutionary force. *Science* **293:**1786-1790.

Pan, X. S., and M. Fisher. 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumonia* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*
41:471-474.

Pares, S., N. Mouz, Y. Petillot, R. Hakenbeck, and O. Dideberg. 1996. X-ray structure of Streptococcus pneumonia PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. struct. Boil.* **3:**284-289.

Park, I. S., C. H. Lin, and C. T. Walsh. 1997. Bacterial resistance to vancomycin: overproduction, purification, and characterization of VanC2 from Enterococcus casseliflavus as D-Ala-D-Ser ligase. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* **94:**10040-10044.

Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 2001. Complete gerome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413:**848-852.

Parris, K. D., L. Lin, A. Tam, R. Mathew, J. Hixon, M Stahl, C. C. Fritz, J. Seehra, and W. S. Somers. 2000. Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangements of molecules resulting in three active sites. *Structure Fold Des.* **8:**883-895.

Patel, H. M., and C. T. Walsh. 2001. In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of back bone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry* **40:**9023-9031.

Patel, U., Y. P. Yan, F. W. Hobbs, Jr., J. Kaczmarczyk, A. M. Slee, D. L. Pomliano, M. G. Kurilla, and E. V. Bobkova. 2001. Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation. *J. Biol. Chem.* **276:**37199-37205.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbial. Rev.* **60:**575-608.

Payne, D. J., J. A. Hueso-Rodriguez, H. Boyd, N. O. Concha, C. A. Janson, M. Gilpin, J. H. Bateson, C. Cheever, N. L. Niconovich, S. Pearson, S. Rittenhouse, D. Tew, E. Diez, P. Perez, J. De La Fuente, M. Rees, and A. Rivera-Sagredo. 2002. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo-beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46:**1880-1886.

Perego, M., and J. A. Hoch. 2001. Functional Genomics of Gram-Positive Micro-organisms: review of the meeting, San Diego, California, 24 to 28 June 2001. *J. Bacteriol.* **183:**6973-6978.

Perna, N. T., G. Plunkett III, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A.

Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409:**529-533.

Perry, R. D., and J. D. Fetherson. 1997. Yersinis pestis—etiologic agent of plague. Clin. *Microbial. Rev.* **10:**35-66.

Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz, and M. Fallman. 1997. The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* **16:**2307-2318.

Petkovic, H., A. Thamchaipenet, L. H. Zhou, D. Hranueli, P. Raspor, P. G. Waterman, and I. S. Hunter. 1999. Disruption of an aromatase/cyclase from oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* results in production of novel polyketides with shorter chain lengths. *J. Biol. Chem.* **274:**32829-32834.

Piepersberg, W. 1997. Molecular biology, biochemistry and fermentation of aminoglycoside antibiotics, p. 842. In W. R. Strohl (ed.), *Biotechnology of Antibiotics,* 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Pioletti, M., *F. Schlunzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Gluhmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath, and F. Franceschi.* 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* **20:**1829-1839.

Poole, K. 2001. Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* **53:**283-294.

Pootoolal, J., M. G. Thomas, C. G. Marshall, J. M. Neu, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, and G. D. Wright. 2002. Assembling the glycopeptides antibiotic scaffold: the biosynthesis of A47934 from Streptomyces topocaensis NRRL15009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99:**8962-8967.

Poulsen, S. M., C. Kofoed, and B. Vester. 2000. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *J. Mol. Biol.* **304:**471-481.

Poulsen, S. M., M. Karlsson, L. B. Johansson, and B. Vester. 2001. The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Mol. Microbiol.* **41:**1091-1099.

Prasch, T., T. Naumann, R. L. Markert, M. Sattler, W. Schubert, S. Schaal, M. Bauch, H. Kogler, and C. Griesinger. 1997. Constitution and solution conformation of the antibiotic mersacidin determined by NMR and molecular dynamics. *Eur. J. Biochem.* **244:**501-512.

Prente, J. L., **and B. Finlay.** 2001. Pathogenesis E. coli, p. 388-422. *In* E. A. Groisman (ed.), *Principles of Bacterial Pathogenesis.* Academic Press Inc., San Diego, California

Pucci, M. J., and T. J. Dougherty. 2002. Direct quantitation of the numbers of individual penicillin-binding proteins per cell in *Staphylococcus aureus. J. Bacteriol.* **184:**588-591.

Puech, V., N. Bayan, K. Salim, G. Leblon, and M. Daffe. 2000. Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* **35:**1026-1041.

Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* **64:**672-693.

Qui, X., C. A. Janson, W. W. Smith, S. M. Green, P. McDevitt, K. Johanson, P. Carter, M. Hibbs, C. Lewis, A.Chalker, A. Fosberry, J. Lalonde, J. Berge, P. Brown, C. S. Houge-Frydrych, and R. L. Jarvest. 2001. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. *Protein Sci.* **10:**2008-2016.

Que, L., Jr. 2000. One motif—many different reactions. *Nat. Struct. Biol.* **7:**182-184.

Quiros, l. M., I. Aguirrezabalaga, C. olano, C. Mendez, and J. A. Salas. 1998. Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by Streptomyces antibioticus. *Mol. Microbiol.* **28:**1177-1185.

Raetz, C. 1987. Structure and biosynthesis of lipid A in E. coli, p. 498-503. In F. C. Neidhart (de.), Wscherichia coli and Salmonella typhimurium: *Cellular and Molecular Biology.* ASM Press, Washington, D.C.

Rajagopalan, P. T., A. Datta, and D. Pei. 1997. Purification, characterization, and inhibition of peptide deformylase from *Escherichia coli. Biochemistry* **36:**13910-13918.

Rasmussen, B. *A., and K. Bush.* 1997. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41:**223-232.

Raviv, Y., *H. B. Pollard, E. P. Bruggemann, I. Pastan, and M. M. Gottesman.* 1990. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug resistant tumors cells. *J. Biol. Chem.*
265:3975-3980.

Rawlings, B. J. 1999. Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat. Prod. Rep.* **16:**425-484.

Rawlings, B. J. 2001a. type I polyketide biosynthesis in bacteria (part A—erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **18:**190-227.

Rawlings, B. J. 2001b. type I polyketide biosynthesis in bacteria (part B). *Nat. Prod. Rep.* **18:**231-281.

Reid, S. D., N. M. Green, J. K. Buss, B. Lei, and J. M. Musser. 2001. Multilocus analysis of extracellular putative virulence proteins made by group A streptococcus: population genetics, human serologic response, and gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98:**7552-7557.

Reuter, K., M. R. Mofid, M. A. Marahiel, and R. Ficner. 1999. Crystal structure of the surfacing synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4' -phosphopantettheinyl transferase superfamily. *EMBO J.* **18:**6823-6831.

Ritter, T. K., and C. H. Wong. 2001. Carbohydrate-based antibiotics: a new approach to tackling the problem of resistance. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40:**3508-3533.

Roach, P. L., I. J. Clifton, C. M. Hensgens, N. Shibata, C. J. Schofield, J. Hajdu, and J. E. Baldwin. 1997. Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387:**827-830.

Robinson, V. L., and A. M. Stock. 1999. High energy exchange: proteins that make or break phosphoramidate bonds. *Structure Fold. Des.* **7:**R47-R53.

Rodnina, M. V., and W. Wintermeyer. 2001. Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem. Sci.* **26:**124-130.

Rodrigue, A., Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean, and M. Foglino. 2000. Two component systems in Pseudomonas aeruginosa: why so many? *Trends Microbiol.* **8:**498-504.

Rodriguez, E., and R. McDaniel. 2001. Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **4:**526-534.

Roestamadji, J., I. Grapsas, and S. Mobashery. 1995. Mechanism-based inactivation of bacterial aminoglycoside 3'-phosphotransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **117:**80-84.

Rohdich, F., K. Kis, A. Bacher, and W. Eisenreich. 2001. The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5:**535-540.

Roper, D. I., T. Huyton, A. Vagin, and G. Dodson. 2000. The molecular basis of vancomycin resistance in clinically relevant enterococci: crystal structure of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:**8921-8925.

Rosamond, J., and A. Allsop. 2000. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* **287:**1973-1976.

Rosen, H., R. Hajdu, L. Silver, H. Kropp, K. Dorso, J. Kohler, J. G. Sundelof, J. Huber, G. G. Hammond, J. J. Jackson, C. J. Gill, R. Thompson, B. A. Pelak, J. H. Epstein-Toney, G. Lankas, R. R. Wilkening, K. J. Wildonger, T. A. Blizzard, F. P. DiNinno, R. W. RAtcliffe, J. V. Heck, J. V. Heck, J. W. Kozarich, and M. L. Hammond. 1999. Reduced immunotoxicity and preservation of antibacterial activity in a releasable side-chain carbapenem antibiotic. *Science* **283:**703-706.

Rowe, C. J., I. U. Bohm, I. P. Thomas, B. Wilkinson, B. A. Rudd, G. Foster, A. P. Blackaby, P. J. Sidebottom, Y. Roddis, A. D. Buss, J. Staunton, and P. F. Leadlay. 2001. Engineering a polyketide with a longer chain by insertion of an extra module into the erythromycin-producing polyketide synthase.
Chem.. Biol. **8:**475-485.

Rozwarski, D. A., G. A. Grant, D. H. Barton, W. R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini. 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis.
Science **279:**98-102.

Rudgers, G. W., W. Huang, and T. Palzkill. 2001. Binding properties of a peptide derived from beta-lactamase inhibitory protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**3279-3286.

Russel, M. 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* **279:**485-499.

Russell, A. D., and I. Chopra. 1996. *Understanding Antibacterial Action and Resistance,* 2nd ed. Ellis Horwood, New York, N.Y.

Sahl, H. G., and G. Bierbaum. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52:**41-79.

Sahm, D. F., C. Thornsberry, D. C. Mayfield, M. E. Jones, and J. A. Karlowsky. 2001. Multidrug-resistant urinary tract isolates of Escherichia coli: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**1402-1406.

Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, and H. Nikaido. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* **12:**265-274.

Sanders, D. A., A. G. Staines, S. A. McMahon, M. R. McNeil, C. Whitfield, and J. H. Naismith. 2001. UDP-galactopyranose mutase has a novel structure and mechanism. *Nat. Struct. Biol.* **8:**858-863.

Sansonetti, P., C. Egile, and C. Wenneras. 2001. Shigellosis: from disease symptoms to molecular and cellular pathogenesis, p. 336-387. In E. A. Groisman (ed.), *Principles of bacterial Pathogenesis. Academic* Press Inc., San Diego, California

Sathyamoorthy, N., and K. Takayama. 1987. Purification and characterization of a novel mucolic acid exchange enzyme from Mycobacterium smegmatis. *J. Biol. Chem.* **262:**13417-13423.

Schauder, S., and B. L. Bassler. 2001. The languages of bacteria. *Genes Dev.* **15:**1468-1480.

Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette, and B. L. Bassler. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* **41:**463-476.

Schentag, J. J., J. M. Hyatt, J. R. Carr, J. A. Paladino, M. C. Birmingham, G. S. Zimmer, and T. J. Cumbo. 1998. Genesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for vancymycin-resistant Enterococcus faecium, and the importance of antibiotic management and infection control. *Clin. Infect. Dis.* **26:**1204-1214.

Schiffer, G., and J. V. Holtje. 1999. Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **274:**32031-32039.

Schlunzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. yonath, and F. Franceschi. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413:**814-821.

Schmitz, F. J., A. C. Fluit, D. Milatovic, J. Verhoef, H. P. Heinz, and S. Brisse. 2000. In vitro potency of moxifloxacin, clinafloxacin and sitafloxacin against 248 genetically defined clinical isolates of Staphylococcus aureus. *J. Antimicrob. Chemother.* **46:**109-113.

Scholar, E. M., and W. B. Pratt. 2000. *The Antimicrobial Drugs,* 2nd ed. Oxford University Press, New York, N.Y.

Schonbrunn, E., S. Sack, S. Eschenburg, A. Perrakis, F. Krekel, N. Amrhein, and E. Mandelkow. 1996. Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl-transferase, the target of the antibiotic fosfomycin. *Structure* **4:**1065-1075.

Schreiber, S. L. 2000. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* **287:**1964-1969.

Schwartz, B., J. A. Markwalder, and Y. Wang. 2001. Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin binding protein (PBP) 1b of *Escherichia coli. J. Am. Chem. Soc.* **123:**11638-11643.

Selinsky, B. S., K. Gupta, C. T. Sharkey, and P. J. Loll. 2001. Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. Biochemistry 40:5172-5180.

Seppala, H., T. Klaukka, J. Vuopio-Varkila, A. Muotiala, H. Helenius, K. Lager, and P. Huovinen. 1997. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *N. Engl. J. Med.* **337:**441-446.

Seto, H. 1999. Biosynthesis of the natural C-P compounds, Bialaphos and fosfomycin, p. 865-880. In D. Barton, K. Nakanishi, and O. Meth-Cohn (ed.), *Comprehensive Natural Products Chemistry,* vol. 1. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y.

Shaw, J. P., G. A. Petsko, and D. Ringe. 1997. Determination of the structure of alanine racemase from Bacillus stearothermophilus at 1.9-A resolution. *Biochemistry* **36:**1329-1342.

Sheldon, P. J., D. A. Johnson, P. R. August, H. W. Liu, and D. H. Sherman. 1997. Characterization of a mitomycin-binding drug resistance mechanism from the producing organism, Streptomyces lavendulae. *J. Bacteriol.* **179:**1796-1804.

Shen, B. 2000. Biosynthesis of aromatic polyketides. Top. **Curr. Chem. 209:**1-51.

Shi, Y., and C. T. Walsh. 1995. Active site mapping of Escherichia coli D-Ala-D-Ala ligase by structure-based mutagenesis. *Biochemistry* **34:**2768-2776.

Shlaes, D. M., D. N. Gerding, J. F. John, Jr., W. A. Craig, D. L. Bornstein, R. A. Duncan, M. R. Eckman, W. E. Farrer, W. H. Greene, V. Lorian, S. Levy, J. E. McGowan, Jr., S. M. Paul, J. Ruskin, F. C. Tenover, and C. Watanakunakorn. 1997a. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin. Infect. Dis.* **25:**584-599.

Shlaes, D. M., D. N. Gerding, J. F. John, Jr., W. A. Craig, D. L. Bornstein, R. A. Duncan, M. R. Eckman, W. E. Farrer, W. H. Greene, V. Lorian, S. Levy, J. E. McGowan, Jr., S. M. Paul, J. Ruskin, F. C. Tenover, and C. Watanakunakorn. 1997b. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **18:**275-291.

Silvian, L. F., J. Wang, and T. A. Steitz. 1999. Insights into editing from an IletRNA synthetase structure with tRNAile and mupirocin. *Science* **285:**1074-1077.

Sinha Roy, R., A. M. Gehring, J. C. milne, p. J. Belshaw, and C. T. Walsh. 1999. Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat. Prod. Rep.* **16:**249-263.

Sinha Roy, R., P. Yang, S. Kodali, Y. Xiong, R. M. kim, P. R. griffin, H. R. onishi, J. kohler, L. L. Silver, and K. Chapman. 2001. Direct interaction of a vancomycin derivative with bacterial enzymes involved in cell wall biosynthesis. *Chem. Biol.* **8:**1095-1106.

Skarzynski, T., A. mistry, A. Wonacott, S. E. Hutchinson, V. A. Kelly, and K. Duncan. 1996. Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure* **4:**1465-1474.

Skarzynski, T., D. H. Kim, W. J. Lees, C. T. Walsh, and K. Duncan. 1998. Sterochemical course of enzymatic enolpyruvyl transfer and catalytic conformation of the active site revealed by the crystal structure of the fluorinated analogue of the reaction tetrahedral intermediate bound to the active site of the C115A mutant of murA. *Biochemistry* **37:**2572-2577.

Solenberg, P. J., P. Matsushima, D. R. Stack, S. C. Wilkie, R. C. Thompson, and R. H. Baltz. 1997. Production of hybrid glycopeptides antibiotics in vitro and in Streptomyces toyocaensis.
Chem. Biol. **4:**195-202.

Soltani, M., D. Beighton, J. Philpott-Howard, and N. Woodford. 2001. Identification of vat(E-3), a novel gene encoding resistance to quinupristin-dalfopristin in a strain of Enterococcus faecium from a hospital patient in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**645-646.

Sosio, M., A. Bianchi, E. Bossi, and S. Donadio. 2000. Teicoplanin biosynthesis genes in *Actinoplanes teichomyceticus. Antonie Leeuwenhoek* **78:**379-384.

Spahn, C. M., G. Blaha, R. K. Agrawal, P. Penczek, R. A. Grassucci, C. A. Trieber, S. R. Connell, D. E. Taylor, K. H. Nierhaus, and J. Frank. 2001. Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance. *Mol. Cell.* **7:**1037-1045.

Spratt, B. G. 1977. Properties of the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K12. *Eur. J. Biochem.* **72:**341-352.

Spratt, B. G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264:**388-393.

Stachelhaus, T., H. D. Mootz, and M. A. Marahiel. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6:**493-505.

Stamm, W. E. 2001. An epidemic of urinary tract infections? *N. Engl. J. Med.* **345:**1055-1057.

Stebbins, C. E., and J. E. Galan. 2000. Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the Salmonella effector SptP bound to Racl. *Mol. Cell* **6:**1449-1460.

Stein, T., S. Borchert, p. Kiesau, S. heinzmann, S. Kloss, C. Klein, M. Helfrich, and K. D. Entian. 2002. Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* **44:**403-416.

Stephenson, K., Y. Yamaguchi, and J. A. Hoch. 2000. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. *J. Biol. Chem.* **275:**38900-38904.

Stermitz, F. R., P. Lorenz, J. N. Tawara, L. A. Zenewicz, and K. Lewis. 2000. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5' – methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:**1433-1437.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. l. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. hufnagle, D. J. Kowalik, M. lagrou, R. l. Garber, l. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrock-Wadman, Y. Yuan, l. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406:**959-964.

Stratigopoulos, G., and E. Cundliffe. 2002. Expression analysis of the tylosinbiosynthetic gene cluster. Pivotal regulatory role of the tylQ product. *Chem.. Biol.* **9:**71-78.

Strohl, W. R. 2001. Biochemical engineering of natural product biosynthesis pathways. *Metab. Eng.* **3:**4-14.

Strynadka, N. C., S. E. Jensen, P. M. Alzari, and M. N. James. 1996. A potent new mode of beta-lactamase inhibition revealed by the 1.7 Å X-ray crystallographic structure of the TEM-1-BLIP complex. *Nat. Struct. Biol.* **3:**290-297.

Sucheck, S. J., and C. H. Wong. 2000. RNA as a target for small molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4:**678-686.
Sugantino, M., and S. L. Roderick. 2002. Crystal structure of Vat(D): an acetyltransferase that inactivates streptogramin group A antibiotics. *Biochemistry* **41:**2209-2216.
Sun, B., Z. Chen, U. S. Eggert, S. J. Shaw, J. V. LaTour, and D. Kahne. 2001. Hybrid glycopeptides antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **123:**12722-12723.
Sutcliffe, J. A. 1988. Novel approaches toward discovery of antibacterial agents. *Annu. Rep. Med. Chem.* **23:**141-150.
Swift, S., J. P. Throup, P. Williams, G. P. Salmond, and G. S. Stewart. 1996. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem. Sci.*
21:214-219.
Takano, E., T. Nihira, Y. Hara, J. J. Jones, C. J. Gershater, Y. Yamada, and M. Bibb. 2000. Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* **275:**11010-11016.
Takei, M., H. Fukuda, R. Kishii, and M. Hosaka. 2001. Target preference of 15 quinolones against Staphylococcus aureus, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**3544-3547.
Tally, F. P., and M. F. DeBruin. 2000. Development of daptomycin for gram-positive infections.
J. Antimicrob. Chemother. **46:**523-526.
Tan, D. S., M. A. Foley, M. D. Shair, and S. L. Schreiber. 1998. Stereoselective synthesis of over two million compounds having structural features both reminiscent of natural products and compatible with miniaturized cell-based assays. *J. Am. Chem. Soc.* **120:**8565-8566.
Tan, D. S., M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, and S. L. Schreiber. 1999. Synthesis and preliminary evaluation of a library of polycyclic small molecules for use in chemical genetic assays.
J. Am. Chem. Soc. **121:**9073-9087.
Tang, L., and R. McDaniel. 2001. Construction of desosamine containing polyketide libraries using a glycosyltransferase with broad substrate specificity. *Chem. Biol.* **8:**547-555.
Tanner, N. K., and P. Linder. 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* **8:**251-262.
Teichmann, S. A., A. G. Murzin, and C. Chothia. 2001. Determination of protein function, evolution and interactions by structural genomics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11:**354-363.
Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollinghead, and C. M. Fraser. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Sterptococcus pneumonia. Science* **293:**498-506.

Thomas, M. G., M. D. Burkart, and C. T. Walsh. 2002. Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undercylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chem.. Biol.* **9:**171-184.

Thomson, K. S., and E. S. Moland. 2000. Version 2000: the new beta-lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* **2:**1225-1235.

Thorson, J. S., T. J. Hosted, J. Q. Jiang, J. B. Biggins, and J. Ahlert. 2001. Nature's carbohydrate chemists: the enzymatic glycosylation of bioactive bacterial metabolites. *Curr. Org. Chem.* **5:**139-167.

Threlfall, E. J. 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.* **46:**7-10.

Throup, J. P., K. K. Koretke, A. P. Brnt, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, A. Marra, N. G. Wallis, J. R. Brown, D. J. Holmes, M. Rosenberg, and M. K. Burnham. 2000. A genomic analysis of two-components signal transduction in *Streptococcus pneumonia. Mol. Microbiol.* **35:**566-576.

Throup, J. P., F. Zappacosta, R. D. Lunsford, R. S. Annan, S. A. Carr, J. T. Lonsdale, A. P. Bryant, D. McDevitt, M. Rosenberg, and M. K. Burnham. 2001. The srhSR gene pair from *Staphylococcus aureus:* genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* **40:**10392-10401.

Toney, J. H., P. M. Fitzgerald, N. Grover-Sharma, S. H. Olson, W. J. May, J. G. Sundelof, D. E. Vanderwall, K. A. Cleary, S. K. Grant, J. K. Wu, J. W. Kozarich, D. L. Pompliano, and G. G. Hammond. 1998. Antibiotic sensitization using biphenyltetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase. *Chem.. Biol.* **5:**185-196.

Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, and O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:**12424-12429.

Trauger, J. W., R. M. Kohli, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, and C. T. Walsh. 2000. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **407:**215218.

Trauger, J. W., and C. T. Walsh. 2000. Heterologous expression in Escherichia coli of the first module of the nonribosomal peptide synthetase for chloroeremomycin, a vancomycin-type glycopeptides antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:**3112-3117.

Trias, J. 2001. The role of combichem in antibiotic discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **4:**520-525.

Trias, J., and Z. Yuan. 1999. Mining bacterial cell wall biosynthesis with new tools: multitarget screens. *Drug Resist. Update* **2:**358-362.

Tsai, F. T., O. M. Singh, T. Skarzynski, A. J. Wonacott, S. Weston, A. Tucker, R. A. Pauptit, A. L. Breeze, J. P. Poyser, R. O'Brien, J. E. Ladbury, and D. B. Wigley. 1997. The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from E. coli complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins* **28:**41-52.

Valegard, K., A. C. van Scheltinga, M. D. Lloyd, T. Hara, S. Ramaswamy, A. Perrakis, A. Thompson, H. J. Lee, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, J. hajdu, and I. Anderson. 1998. Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **394:**805-809.

van Asselt, E. J., K. H. Kalk, and B. W. Dijkstra. 2000. Crystallographic studies of the interactions of Escherichia coli lytic transglycosylase S1t35 with peptidoglycan. *Biochemistry* **39:**1924-1934.

van Heijenoort, J. 2001a. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**:25R-36R.

van Heijenoort, J. 2001b. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan. monomer unit. **Nat. Prod. Rep. 18**:503-519.

VanNieuwenhze, M. S., S. C. Mauldin, M. Zia-Ebrahimi, B. E. Winger, W. J. Hornback, S. L. Saha, J. A. Aikins, and L. C. Blaszczak. 2002. The first total synthesis of lipid II: the final monomeric intermediate in bacterial cell wall biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **124**:3656-3660.

van Wageningen, A. M., P. N. Kirkpatrick, D. H. Williams, B. R. Harris, J. K. Kershaw, N. J. Lennard, M. Jones, S. J. Jones, and P. J. Solenberg. 1998. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* **5**:155-162.

Vester, B., and S. Douthwaite. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1-12.

Vining, L. C., and C. Stuttard. 1995. Chloramphenicol. *Biotechnology* **28**:505-530.

Vollmer, W., and J. V. Holtje. 2000. A simple screen for murein transglycosylase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1181-1185.

von Dohren, H., U. Keller, J. Vater, and R. Zocher. 1997. Multifunctional peptide synthetases.
Chem.. Rev. **97**:2675-2706.

Walsh, C. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms.* W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.

Walsh, C. T. 1988. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly.
J. Biol. Chem. **264**:2393-2396.

Walsh, C. T., T. E. Benson, D. H. Kim, and W. J. Lees. 1996a. the versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. *Chem.. Biol.* **3**:83-91.

Walsh, C. T., S. L. Fisher, I. S. park, M. Prahalad, and Z. Wu. 1996b. bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem. Biol.* **3**:21-28.

Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases.. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:635-692.

Wang, Z., W. Fast, A. M. Valentine, and S. J. Benkovic. 1999. Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:614-622.

Watson, W. T., T. D. Minogue, D. L. Val, S. B. von Bodman, and M. E. Churchill. 2002. Structural basis and specificity of acly-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing.
Mol. Cell. **9**:685-694.

Wenzel, R. P., and M. B. Edmond. 2000. Managing antibiotic resistance. *N. Engl. J. Med.* **343**:1961-1963.

Wess, G., M. Urmann, and B. Sickenberger. 2001. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**:3341-3350.

White,D. G., S. Zhao, R. Sudler, S. Ayers, S. Friedman, S. Chen, P. F. McDermott, S. McDermott, D. W. Wagner, and J. Meng. 2001. The isolation of antibiotic resistant Salmonella from retail ground meats.
N. Engl. J. Med. **345**:1147-1154.

Whittle, G., B. D. Hund, N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers. 2001. Characterization of the 13-kilobase ermF region of the Bacteroides conjugative transposon CTnDOT. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3488-3495.
Wiedemann, B., C. kliebe, and M. Kresken. 1989. The epidemiology of beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**(Suppl. B):1-22.
Wilkinson, B., G. Foster, B. A. Rudd, N. L. Taylor, A. P. Blackaby, P. J. Sidebottom, D. J. Cooper, M. J. Dawson, A. D. Buss, S. Gaisser, I. U. Bohm, C. J. Rowe, J. Cortes, P. F. Leadlay, and J. Staunton. 2000. Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chem. Biol.* **7**:111-117.
Williams, D. H. 1996. The glycopeptides story—how to kill the deadly *"superbugs." Nat. Prod. Rep.* **13**:469-477.
Williams, D. H., and B. Bardsley. 1999. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**:1172-1193.
Williams, R. J., and D. l. Heymann. 1998. Containment of antibiotic resistance. *Science* **279**:1153-1154.
Wilson, M., J. DeRisi, H. H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P. O. Brown, and G. K. Schoolnik. 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12833-12838.
Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit.
Nature **407**:327-339.
Winzer, K., C. Falconer, N. C. Garber, S. P. Diggle, M. Camara, and P. Williams. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS.
J. Bacteriol. **182**:6401-6411.
Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**:996-997.
Wolfson, J. S., and D. C. Hooper. 1989. *Quinolone Antimicrobial Agents.* ASM Press, Washington, D.C.
Wright, G. E. 1999. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:499-503.
Xu, G. Y., A. Tam, L. Lin, J. Hixon, C. C. Fritz, and R. Powers. 2001. Solution structure of B. subtilis acyl carrier protein. *Structure* **9**:277-287.
Xue, Y., and D. A. Sherman. 2001. Biosynthesis and combinatorial biosynthesis of pikromycin-related macrolides in Sterptomyces venezuelae. *Metab. Eng.* **3**:15-26.
Yamada, Y., and T. Nihara. 1999. Microbial hormones and microbial chemical ecology, p. 377-413. In D. Barton, K. Nakanishi, and O. Meth-Cohn (ed.), *Comprehensive Natural Products Chemistry,* vol. 8 Elsevier, Oxford, United Kingdom.
Yano, H., A. Kuga, K. irinoda, R. Okamoto, T. Kobayashi, and M. Inoue. 1999. Presence of genes for beta-lactamases of two different classes on a single plasmid from a clinical isolate of *Serratia marcescens.*
J. Antibiot. **52**:1135-1139.

Ye, X. Y., M. C. Lo, L. Brunner, D. Walker, D. Kahne, and S. Walker. 2001. Better substrates for bacterial transglycosylases. *J. Am. Chem. Soc.* **123:**3155-3156.
Yin, C. C., M. L. Aldema-Ramos, M. I. Borges-Walmsley, R. W. Taylor, A. R. Walmsley, S. B. Levy, and P. A. Bullough. 2000. The quarternary molecular architecture of TetA, a secondary tetracycline transporter from *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* **38:**482-492.
Young, R., I. N. Wang, and W. D. Roof. 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* **8:**120-128.
Yusupov, M. M., G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, and H. F. Noller. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution. *Science* **292:**883-896.
Yusupova, G. Z., M. M. Yusupov, J. H. D. Cate, and H. F. Noller. 2001. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106:**233-241.
Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature* **415:**389-395.
Zhang, H. Z., C. J. Hackbarth, K. M. Chansky, and H. F. Chambers. 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* **291:**1962-1965.
Zhang, Y. X., K. Perry, V. A. Vinci, K. Powell, W. P. Stemmer, and S. B. del Cardayre. 2002. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature* **415:**644-646.
Zhang, Z., J. Ren, D. K. Stammers, J. E. Baldwin, K. Harlos, and C. J. Schofield. 2000. Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat. Struct. Biol.*
7:127-133.
Zhao, L. S., J. Ahlert, Y. Q. Xue, J. S. Thorson, D. H. Sherman, and H. W. Liu. 1999. Engineering a methymycin/pikromycin-calicheamicin hybrid: construction of two new macrolides carrying a designed sugar moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **121:**9881-9882.
Zheleznova, E. E., P. N. Markham, A. A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 1999. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. *Cell* **96:**353-362.
Zheleznova, E. E., P. Markham, R. Edgar, E. Bibi, A. A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 2000. A structure-based mechanism for drug binding by multidrug transporters. *Trends Biochem. Sci.* **25:**39-43.
Zimmermann, N., and G. Jung. 1997. The three-dimensional solution structure of the lantibiotic murein-biosynthesis-inhibitor actagardine determined by NMR. *Eur. J. Biochem.* **246:**809-819.

ثبت المصطلحات

أولاً: عربي - إنجليزي



أنديكابرينيل فوسفوبانتيثينيل سينثازC_{55}	C_{55} Undecaprenyl phosphopantetheinyl synthase
إيبيفانكوميسين	Epivancomycin
أحماض دهنية	Fatty acids
إختبار الحساسية	Susceptibility testing
إرتابينيم	Ertapenem
إروينيا كاروتوفورا	*Erwinia carotovora*
إريثروميسين	Erythromycin
أزتيريونام	Aztreonam
أزيثروميسين	Azithromycin
إستشعار النصاب	Quorum sensing
أسيتيل —CoA	Acetyl-CoA
أسيل هوموسيرين لاكتونات	Acylhomoserine lactones
أعلاف (أغذية) الحيوانات	Animal foods
أغشية الخلية	Cell membranes
إفراز	secretion
إفراز البروتين	Protein secretion

أفوبارسين	avoparcin
أكتينوبلانيس	Actinoplanes
أكتينورودين	Actinorrhodin
أكتينونين	Actinonine
الأجهزة (الأنظمة) المنظمة ذات – المركبين	Two-component-systems
الأدنلة (أدينيليشن)	Adenylation
الأستلة (أسيتيليشن)	Acetylation
الإشريكية القولونية	*Eschericia coli*
الأفلام الحيوية	Biofilms
الأمراض البكتيرية الناشئة	Emerging infectious diseases
إل–امينو أديبيل–إل–سيستينيل–د–فالين سينثازات	L-aminoadepyl-L-cysteinyl-D-valine synthases
إل–أمينوأديبيل–إل–سيستينيل–إل–فالين	L-aminoadepyl-L-cysteinyl-L-valine
الأنماط الظاهرية Van	Van phenotypes
الآنين راسيماز	Alanine recemase
البروتين الحال للدم	Hemolysin protein
البروتين الحامل لأسيل	Acyl carrier protein
البروتين المثبط لبيتالاكتاماز	Beta –lactamsae inhibitor protein
البروتينات المرتبطة – بالبنسيلّين	Penicillin -binding proteins
البكتيريا السالبة – لغرام	Gram-negative bacteria
البكتيريا الموجبة – لغرام	Gram –positive bacteria
البناء الحيوي	biosynthesis
البناء الحيوي لجدار الخلية	Cell wall biosynthesis
البناء الحيوي للبروتين	Protein biosynthesis
البناء الحيوي للمضاد الحيوي	Antibiotic biosynthesis
البيتيد المُحث الذاتي الناضج	Mature autoinducing peptide
التزامرية التشابكية	Isomerization

DNA	الحمض النووي — دنا
RNA	الحمض النووي الريبي - رنا
Tuberculosis	الدرن (السل)
Lipid A	الدهن A
Cross linking	الربط التبادلي
Pseudomonas aeruginosa	الزائفة الزنجارية
Agriculture	الزراعة
Shigella dysentriae	الشيغيلا الزحارية
Small multidrug regulatory family	العائلة الصغيرة المتعدِّدة الدواء المنظمة
Major facilitator subfamily	العائلة الفرعية الرئيسية المساعدة
Nosocomial infections	العداوى المستشفوية
Bacteroides fragilis	العصوانية الهشة
Bacillus subtilis	العصية الرقيقة
Proton motive force	القوة الدافعة للبروتون
Klebsiella pneumoniae	الكلبسيلة الرئوية
Combinational chemistry	الكيمياء الاندماجية (الاتحادية)
Streptomyces	المتسلسلة
Streptomyces antibioticus	المتسلسلة انتيبيوتيكس
Streptomyces peucetius	المتسلسلة بيوسيتيس
Streptomyces tovocaensis	المتسلسلة توفوكانسيس
Streptomyces fradiae	المتسلسلة فرادي
Streptomyces virginiae	المتسلسلة فيرجيني
Streptomyces vinzeuelae	المتسلسلة فينزويلي
Streptomyces calvuligerus	المتسلسلة كالفوريجيريس
Streptomyces coelicolor	المتسلسلة كوليكولر
Streptomyces lavendulae	المتسلسلة لافينديولي

المتسلسلة ويندمورينسيس	*Streptomyces wedmorensis*
المتفطرة السلية	*Mycobacterium tuberculosis*
المحثات الذاتية للنصاب —AI-2	AI-2 quorum autoinducers
المضادّات الحيوي – المعتمدة على – الكالسيوم	Calcium –dependent antibiotics
المضادّات الحيوية	Antibiotics
المضادّات الحيوية الجديدة	Novel antibiotics
المضادّات الحيوية الجديدة	New antibiotics
المطثية العسيرة	*Clostridium perfringens*
المعالجة التوليفية	Combination therapy
الفراغ حول الجبلَة	Periplasmic space
المقاومة المتعدِّدة – الدواء	Multi-drug resistance
المكورات العقدية المعوية	Enterococci
المكورة العقدية الرئوية	*Streptococcus pneumoniae*
المكورة العقدية القيحية	*Streptococcus pyogenes*
المكورة العنقودية الذهبية	*Staphylococcus aureus*
النشوء (التَطوُّر)	Evolution
أموكسيسيلين	Amoxicillin
أموكسيسيلين – سلبكتام	Amoxicillin-sulbactam
أموكسيسيلين– كلافولينيت	Amoxicillin-clavulanate
إميبينيم	Imipenem
أميكولتوبسيس أورينتاليز	*Amycoltopsis orientalis*
أمينوغليكوسيدات	Aminoglycosides
أمينوكومارينات	Aminocoumarins
إصلاح	Repair
إنتيروفلوكساسين	Enterofloxacin
إنجذاب	Affinity

أنديسيل بروديوجيوسين إنزيم تركيبي-سينثاز	Undecyle prodiogiosin synthase
إنزيم GlmU	GlmU enzyme
إنزيم LpxC	LpxC enzyme
إنزيم MraY	MraY enzyme
إنزيمات Mur	Mur enzymes
أنظمة الإفراز	Secretion systems
أهداف	Targets
أهداف بكتيرية	Bacterial targets
أورتافاسين	Ortavacin
أوكسيتتراسيكلين	Oxytetracycline
أولياندوميسين	Oleandomycin
إيبوثيولون	Epothiolone
أيزوبنسيلّين N	Isopencillin N
أيزوستريت لياز	Isocitrate lyase
أيزونيازيد	Isoniazid
إيفيرنيموميسين	Evernimomycin

ب

باستراسين	Bacitracin
بديل (مستبدل)	Substituent
بروبيونيل-CoA	Propionyl-CoA
بروتين MipA	MipA protein
بروتين OmpR	OmpR protein
بروتين TolC	TolC protein
بروتين VmsR	VmsR protein
بروتينات AfsQ	AfsQ proteins

Agr proteins	بروتينات Agr
Amp proteins	بروتينات Amp
Arp proteins	بروتينات Arp
Bar proteins	بروتينات Bar
Bla proteins	بروتينات Bla
Bmr proteins	بروتينات Bmr
LuxI proteins	بروتينات LuxI
Mec proteins	بروتينات Mec
Orf proteins	بروتينات Orf
Tet proteins	بروتينات Tet
Tyl proteins	بروتينات Tyl
Var ptoteins	بروتينات Var
Vnc proteins	بروتينات Vnc
Cut proteins	بروتينات القطع (الكسر)
Streptomyces antibiotic regulatory proteins	بروتينات المتسلسلة المنظمة للمضاد الحيوي
Pristinamycins	بريستيناميسينات
Bacteria	بكتيريا
Pleuromutilin	بليوروميوتيلين
Bleomycin	بليوميسين
Penicillin	بنسيلّين
Polyketide synthases	بوليكيتيد سينثازات
Polymxin B	بوليميكسين B
Peptide deformylase	ببتيد ديفورميلاز
Pentapeptide	ببتيد خماسي
Heptapeptide	ببتيد سباعي
Lipopeptides	بِبْتيدات دهنية
Peptidyltransferases	ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) (إنزيمات حفّازة ناقلة للبِبْتيديل)

Beta-lactamases	بيتالاكتامازات
Metallo-beta-lactamases	بيتالاكتامازات – المعدنية
Extended -spectrum –beta -lactamases	بيتا لكتامازات الممتدة – المدى
Pyrrhocoricin	بيروكوريسين
Butaneolides	بيوتانيوليدات
Puromycin	بيوروميسين

ت

Tazobactam	تازوبكتام
Tetracycline	تتراسيكلين
Tetracenomycin	تتراسينوميسين
Transpeptidation	نقل الببتيد
Transglycosylation	نقل ارتباط بالغليكوزيل
Triclosan	ترايكلوسان
Trimethoprim	ترايميثوبريم
Trimethoprim-sulfamethoxazole	ترايميثوبريم – سلفاميثوكسازول
Cyclization	تحليق
Translation	ترجمة (إنتساخ)
Sequence	تسلسل
Replication	تكرار
Tobramycin	توبراميسين
Topoisomerases	توبوأيزوميرازات
Tiamulin	تياميولين
Tigilicycline	تيجيليسيكلين
Tyrocidine	تيروسيدين
Teicoplanin	تيكوبلانين
Tylosin	تيلوسين

تيليثروميسين	Telithromycin

ث

ثنائي الجزيء	Dimeric
ثنائي هيدروأوكسييتربتوميسين	Dihydrooxystreptomycin
ثنائي هيدروبيترويت سينثاز	Dihydropetroate synthase
ثنائي هيدروفوليت ريدكتاز	Dihydrofolate reductase
ثيناميسين	Thienamycin
ثيوإستيرازات	Thioesterases
ثيوبتْيدات	Thiopeptides
ثيوستربتون	Thioesterases

ج

جاتيفلوكساسين	Gatifloxacin
جراماسيدين S	Gramacidin -S
جليسيلسيكلينات	glycylcylines
جنتاميسين	Gentamicin

ح

حماية – ذاتية	Self-protection
حمض الفوليك	Folic acid
حمض تيكويك	Teichoic acid

د

دابتوميسين	Daptomycin
د-الانيل-د-الآنين ليغاز	D- alanyl-D-alanine ligase
دالفوبريستين	Dalfopristin
د-د-ليغاز	D-D-ligase

دنا- توبوأيزوميرازات	DNA-topoisomerases
دنا- غايراز	DNA gyrase
دوكسوروبيسين	Doxorubicin
دوكسيسيكلين	Doxycycline
دونوروبيسين	Daunorubicin
ديوكسي إريثرونوليد B	Deoxyerythronolide B
ديوكسي إريثرونوليد سينثازاتB	Deoxyerythronolide B synthases

ر

راسيماز	Racemase
راموبلانين	Ramoplanine
رامز (راموز)	Codon
رنا (الحمض النووي الريبي)	RNA
ريبوسومات	Ribosomes
ريفامبين	Rifampin
ريفاميسينات	Rifamycins

ز

زنك هيدرولازات (الإنزيم الحال للزنك)	Zinc hydrolases
زوج البروتين BtuCD	BtuCD protin pair

س

سالمونيلا	*Salmonella*
سالمونيلا إنتيريكا الضرب المصلي تيفيميوريم DT104	*Salmonella enteric* serovar Typhimurium DT104
سبروفلوكساسين	Ciprofloxacin
سبيكتينوميسين	Spectinomycin
ستربتوجرامينزات	Streptogramins

ستربتوميسين	Streptomycin
سلفاميثوكسازول	Sulfamethoxazole
سلفاميثوكسازول – ترايميثوبريم	Sulfamethoxazole-trimethoprim
سلسلة جانبية	Side chain
سم CsdB	CsdB toxin
سم الكوليرا (الضمة)	Cholera toxin
سم شيغا	Shiga toxin
سموم (ذيفانات)	Toxins
سورتاز	Sortase
سورفاكتين	surfactin
سولبكتام	sulbactam
سيتافلوكساسين	sitafloxacin
سيرولينين	Cerulenin
سيريشيا مارسيسينز	*Serratia marscesens*
سيرين هيدروليزات	Serine hydrolases
سيفتازيديم	Ceftazidime
سيفوتاكسيم	Cefotaxime
سيكلوثياليدين	cyclothialidine
سينثازات الحمض الدهني	Fatty acid synthases
سينيرسيد	Synercid

ط

طبقة ببتيدوغليكان	Peptidoglycan
طبقة ميورين	Murine layer

ع

عائلة الكاسيت الرابط لـ ATP-	ATP-cassette binding family

عوامل الفوعية	Virulence factors

غ

غلوتاثيون - إس - ترانسفيراز	Glutathione-S- transferases
غلوتامات	Glutamate
غليكوببْتيدات	Glycopeptides
غليكوببْتيدات دهنية	Lipoglycopeptides
غليكوزيل ترانسفيرازات	Glycosyltransferases

ف

فالنيميولين	Valenemulin
فانكوميسين	Vancomycin
فسفرة (فوسفوريليشن)	Phosphorylation
فلوروكوينولونات	Fuoroquinolones
فوسفوميسين	Fosfomycin
فوسفونوبانتيثينيل ترانسفيرازات	Phosphopantetheinyl transferases
فيرجينياميسينات	Virginiamycins

ك

كابح للبكتيريا	Bacteriostatic
كاربابينيمات	Carbapenems
كاربوميسين	Carbomycin
كاناميسين	Kanamycin
كلاريثروميسين	Clarithromycin
كلافولينيت	Clavulanate
كلورامفينيكول	Chloramphenicol
كلورتتراسيكلين	Chlortetacycline

كلوروإرموميسين	Chloroermomycin
كلوروبيوسين	Chlorobiocin
كلينافلوكساسين	Clinafloxacin
كومارينات	Couumarins
كومرميسين	Coumermycin
كوينوبريستين	Quinopristin
كوينولونات	Quinolones
كيتيدات / كيتوليدات / بوليكيتيدات	Ketides/ ketolides/ polyketides
كيفالوسبورينات	Cephalosporins

ل

لانتيبيوتيكات	Lantibiotics
لاصقات	Adhesions
لكتامازات TEM	TEM lactamases
ليفوفلوكساسين	Levofloxacin
لينكوساميد	Lincosamide
لينيزوليد	Linezolid

م

ماكروليدات	Macrolides
مبيد (قاتل) للبكتيريا	Bactericidal
متغيرات	Variants
مشيلين	Methicillin
مجين	Genome
مركبات الأمونيوم (النشادر) الرباعية	Quaternary ammonium compounds
مركب ناقص القسمة	Oligomer
مسار ميفالونيت	Mevalonate pathway

مسح	Screening
مضادّات ببتيد الحيوية	Peptide antibiotics
مضادّات بيتالاكتام الحيوية	Beta lactam antibiotics
مضخات التدفق	Efflux pumps
مضخة MalK	MalK pump
مقاومة	Resistance
مقايسة (فحص)	Assay
مكتبات	Libraries
مواد انتحارية	Suicide substrates
موإينوميسين	Moenomycin
موحود (مركب أحادي)	Monomer
مولد للبروتين	Proteogenic
مونوأكسيجينازات	Monooxygenases
مونوباكتامات	Monobactams
ميتوميسين	Mitomycin
ميثيلينميسين	Methylenemycin
ميثيونين أمينوببتيداز	Methionine aminopeptidase
ميرساسيدين	Mersacidin
ميروبينيم	Meropenem
ميكروسين B17	Microcin B17
ميكوسوبتيلين	Mycosubtilin
ميكوليل ترانسفيرازات	Mycolyltransferases
مينوسيكلين	Minocycline
مينيميسين	Minimycin
ميوبيروسين	Mupirocin
ميوريدوميسينات	Mureidomycins

ن

نافثيل–داي ببتيد	Naphthyl - dipeptide
نوسيهيبتيد	Nosiheptide
نوفوبيوسين	Novobiocin
نيامين	Neamin
نيسين	Nicin
نيومايسينات	Neomycins
نهاية / نهايات	Terminus / termini

هـ

هياكل (سقالات)	Scaffolds
هيجروميسين B	Hygrocin B

و

وسيطات الدهن I وII	Lipid I and II intermediates

ي

يرسينيا	*Yersinia*

ثانياً: إنجليزي– عربي

A

Abs proteins	بروتينات Abs
Acetyl-CoA	أسيتيل —CoA
Acetylation	الأستلة (أسيتيليشن)
Actinonin	أكتينونين
Actinoplanes	أكتينوبلانيس
Actinorhodin	أكتينورودين
Acyl carrier protein	البروتين الحامل لأسيل
Acylhomoserine lactones	أسيل هوموسيرين لاكتونات
Adenylation	الأدنلة (أدينيليشن)
Affinity	انجذاب
AfsQ proteins	بروتينات AfsQ
Agr proteins	بروتينات Agr
Agriculture	الزراعة
AI-2 quorum autoinducers	المحثات الذاتية للنصاب —AI-2
Alanine recemase	الآنين راسيماز
Aminocoumarins	أمينوكومارينات
Aminoglycosides	أمينوغليكوسيدات
Amoxicillin	أموكسيسيلين
Amoxicillin-clavulanate	أموكسيسيلين – كلافولينيت
Amoxicillin-sulbactam	أموكسيسيلين – سلبكتام
Amp proteins	بروتينات Amp
Amycoltopsis orientalis	أميكولتوبسيس أورينتاليز
Antibiotics	المضادّات الحيوية
Antibiotic biosynthesis	البناء الحيوي للمضاد الحيوي

Arp proteins	بروتينات Arp
Assay	مقايسة (تحليل)
ATP-binding cassette family	عائلة الكاسيت الرابط لـ ATP
Avoparcin	أفوبارسين
Azithromycin	أزيثروميسين
Aztreornam	أزتيريونام

B

Bacillus subtilis	العصية الرقيقة
Bacitracin	باستراسين
Bacteria	بكتيريا
Bacterial targets	أهداف بكتيرية
Bactericidal	مبيد (قاتل) للبكتيريا
Bacteriostatic	مثبط (كابح) للبكتيريا
Bacteroides fragilis	العصوانية الهشة
Bar proteins	بروتينات Bar
Beta-lactam antibiotics	مضادّات بيتالاكتام الحيوية
Beta-lactamase inhibitory protein	البروتين المثبط لبيتالاكتاماز
Beta-lactamases	بيتالاكتامازات
Biofilms	الأفلام الحيوية
Biosynthesis	البناء الحيوي
Bla proteins	بروتينات Bla
Bleomycin	بليوميسين
Bmr proteins	بروتينات Bmr
BtuCD protein pair	زوج البروتين BtuCD
Butaneolides	بيوتانيوليدات

C

C_{55} undecaprenyl phosphopantetheinyl synthase	C_{55}أنديكابرينيل فوسفوبانتيثينيل سينثاز
Calcium –dependent antibiotic	المضاد الحيوي –المعتمدة على–الكالسيوم
Carbapenems	كاربابينيمات
Carbomycin	كاربوميسين
CsdB toxin	سم CsdB
Cefotaxime	سيفوتاكسيم
Ceftazidime	سيفتازيديم
Cell membranes	أغشية الخلية
Cell wall biosynthesis	البناء الحيوي لجدار الخلية
Cephalosporins	كيفالوسبورينات
Cerulenin	سيرولينين
Chloramphenicol	كلورامفينيكول
Chlorobiocin	كلوروبيوسين
Chloroermomycin	كلوروإرموميسين
Chlortetracycline	كلورتتراسيكلين
Cholera toxin	سم الكوليرا (الضمة)
Ciprofloxacin	سبروفلوكساسين
Clarithromycin	كلاريثروميسين
Clavulanate	كلافولينيت
Clinafloxacin	كلينافلوكساسين
Clostridium difficile	المطثية العسيرة
Combination therapy	المعالجة التوليفية
Combinational chemistry	الكيمياء الاندماجية (الاتحادية)
Coumarins	كومارينات
Coumermycin	كومرميسين

Cross linking	ربط تبادلي
Cut proteins	بروتينات القطع (الكسر)
Cyclization	تحليق
Cyclothialidine	سيكلوثياليدين

D

D-Alanyl-D-alanine ligase	د-الانيل-د-الآنين ليغاز
Dalfopristin	دالفوبريستين
Daptomycin	دابتوميسين
Daunorubicin	دونوروبيسين
D-D-Ligase	د-د-ليغاز
Deoxyerythronolide B	ديوكسي إريثرونوليد B
Deoxyerythronolide B synthases	ديوكسي إريثرونوليد B سينثازات
Dihydrofolate reductase	ثنائي هيدروفوليت ريدكتاز
Dihydropetroate synthase	ثنائي هيدروبيترويت سينثاز
Dihydroxystereptomycin	ثنائي هيدروأوكسيبيتربتوميسين
Dimeric	ثنائي الجزيء (مثنوي)
DNA	الحمض النووي — دنا
DNA gyrase	دنا- غيراز (الإنزيم اللفائفي لدنا)
DNA topoisomerases	دنا- توبوأيزوميرازات
Doxorubicin	دوكسوروبيسين
Doxycycline	دوكسيسيكلين

E

Efflux pumps	مضخات التدفق
Emerging bacterial diseases	الأمراض البكتيرية الناشئة
Enterococci	المكورات العقدية المعوية

Enterofloxacin	إنتيروفلوكساسين
Epivancomycin	إبيفانكوميسين
Epothilone	إيبوثيولون
Ertapenem	إرتابينيم
Erwinia carotovora	إروينيا كاروتوفورا
Erythromycin	إريثروميسين
Escherichia coli	الإشريكية القولونية
Evernimomycin	إيفيرنيموميسين
Evolution	التَّطوُّر
Extended-spectrum beta-lactamases	بيتالاكتامازات الممتدة – المدى

F

Fatty acids	أحماض دهنية
Fatty acid synthases	سينثازات الحمض الدهني
Fluoroquinolones	فلوروكوينولونات
Folic acid	حمض الفوليك
Food animals	أعلاف (أغذية) الحيوانات
Fosfomycin	فوسفوميسين

G

Gatifloxacin	جاتيفلوكساسين
Gentamicin	جنتاميسين
Genome	مجين
GlmU enzyme	إنزيم GlmU
Glutamate	غلوتامات
Glutathione-S-transferase	غلوتاثيون– إس–ترانسفيراز
Glycopeptides	غليكوببْتيدات

Glycosyltransferases	غليكوزيل ترانسفيرازات
Glycylcyclines	غليسيلسيكلينات
Gram –negative bacteria	البكتيريا السالبة – لغرام
Gram –positive bacteria	البكتيريا الموجبة – لغرام
Gramacidin S	جراماسيدين S
Gyrase	غيراز (الإنزيم اللفائفي)

H

Hemolysin protein	البروتين الحال للدم
Heptapeptide	ببتيد سباعي
Hygromycin B	هيجروميسين B

I

Imipenem	إميبينيم
Isocitrate lyase	أيزوستريت لياز
Isomerization	التزامرية التشابكية
Isoniazid	أيزونيازيد
Isopenecillin N	أيزوبنسيلّين N

K

Kanamycin	كاناميسين
Ketides / ketolides / polyketides	كيتيدات / كيتوليدات / بوليكيتيدات
Klebsiella pneumoniae	الكلبسيلة الرئوية

L

L-Aminoadipyl-L-cysteinyl-L-valine (ACV)	إل–أمينوأديبيل–إل–سيستينيل–إل–فالين
L-Aminoadipyl-L-cesteinyl-D-valine (ACV) synthase	إل–امينو أديبيل–إل–سيستينيل–د–فالين سينثاز (إنزيم تركيبي) (ACV)

Lantibiotics	لانتيبيوتيكات
Levofloxacin	ليفوفلوكساسين
Libraries	مكتبات
Lincosamide	لينكوساميد
Linezolid	لينيزوليد
Lipid A	الدهن A
Lipid I and II intermediates	وسيطات الدهن I وII
Lipoglycopeptides	غليكوبِبْتيدات دهنية
Lipopeptides	بِبْتيدات دهنية
LpxC enzyme	إنزيم LpxC
LuxI proteins	بروتينات LuxI

M

Macrolides	ماكروليدات
Major facilitator subfamily	العائلة الفرعية الرئيسية المساعدة
MalK pump	مضخة MalK
Mature autoinducing peptide	الببتيد المُحث الذاتي الناضج
Mec proteins	بروتينات Mec
Meropenem	ميروبينيم
Mersacidin	ميرساسيدين
Metallo-beta-lactamases	بيتالاكتامازات–المعدنية
Methicillin	مثيسيلين
Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA)
Methionine aminopeptidase	ميثيونين أمينوببتيداز
5'-Methoxyhydnocarpin D	'5- ميثوكسي هيدنوكاربين D
Methylenemycin	ميثيلينميسين
Mevalonate pathway	مسار ميفالونيت

Microcin B17	ميكروسين B17
Minimycin	مينيميسين
Minocycline	مينوسيكلين
MipA protein	بروتين MipA
Mitomycin	ميتوميسين
Moenomycin	موإينوميسين
Monobactams	مونوباكتامات
Monomer	موحود (مركب أحادي)
Monooxygenases	مونوأكسيجينازات
MraY enzyme	إنزيم MraY
Multi-drug resistance	المقاومة المتعدِّدة-الدواء
Mupirocin	ميوبيروسين
Mur enzymes	إنزيمات Mur
Mureidomycins	ميوريدوميسينات
Murein layer	طبقة ميورين
Mycobacterium tuberculosis	المتفطرة السلية
Mycolyltransferases	ميكوليل ترانسفيرازات
Mycosubtlin	ميكوسوبتيلين

N

Naphthyl-dipeptide	نافثيل-ثنائي الببتيد
Neamine	نيامين
Neomycins	نيومايسينات
New antibiotics	المضادّات الحيوية الجديدة
Nisin	نيسين
Nosiheptide	نوسيهيبتيد
Nosocomial infections	العداوى المستشفوية

Novel antibiotics	المضادّات الحيوية الجديدة
Novobiocin	نوفوبيوسين

O

Oleandomycin	أولياندوميسين
Oligomeric	مركب ناقص القسمة
OmpR protein	بروتين OmpR
Orf proteins	بروتينات Orf
Ortavacin	أورتافاسين
Oxytetracycline	أوكسيتتراسيكلين

P

Penicillin	بنسيلّين
Penicillin-binding proteins	البروتينات المرتبطة- بالبنسيلّين
Pentapeptide	ببتيد خماسي
Peptide antibiotics	مضادّات ببتيد الحيوية
Peptide deformylase	ببتيد ديفورميلاز
Peptidoglycan layer	طبقة ببتيدوغليكان
Peptidyltransferases	ببتيديل ترانسفيرازات (ناقلة الببتيديل)
Phosphonopantetheinyltransferase	فوسفونوبانتيثينيل ترانسفيرازات
Phosphorylation	فسفرة (فوسفوريليشن)
Pleuromutilin	بليوروميوتيلين
Polyketide synthases	بوليكيتيد سينثازات
Polymyxin B	بوليميكسين B
Porins	مسامات
Pristinamycins	بريستيناميسينات
Propionyl-CoA	بروبيونيل-CoA

Protein biosynthesis	البناء الحيوي للبروتين
Protein secretion	إفراز البروتين
Proton motive force	القوة الدافعة للبروتون
Pseudomonas aeruginosa	الزائفة الزنجارية
Puromycin	بيوروميسين
Pyrrhocoricin	بيروكوريسين

Q

Quaternary ammonium compounds	مركبات الأمونيوم (النشادر) الرباعية
Quinolones	كوينولونات
Quinupristin	كوينوبريستين
Quorum sensing	إستشعار النصاب

R

Racemase	راسيماز
Ramoplanin	راموبلانين
Repair	إصلاح
Resistance	مقاومة
Ribosomes	ريبوسومات
Rifampin	ريفامبين
Rifamycins	ريفاميسينات
RNA	الحمض النووي الريبي - رنا

S

Salmonella	سالمونيلا
Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104	سالمونيلا إنتيريكا الضرب المصلي تيفيميوريم DT104
Scaffold	هيكل (سقالة)

Screening	مسح
Secretion	إفراز
Secretion systems	أنظمة الإفراز
Self-protection	حماية–ذاتية
Serine hydrolases	سيرين هيدرولاز
Serratia marcescens	سيريشيا مارسيسينز
Sequence	تسلسل
Shiga toxin	سم شيغا
Shigella dysenteriae	الشيغيلا الزحارية
Side chain	سلسلة جانبية
Sitafloxacin	سيتافلوكساسين
Small multidrug regulator family	العائلة الصغيرة المتعدِّدة الدواء المنظمة
Sortase	سورتاز
Spectinomycin	سبيكتينوميسين
Staphylococcus aureus	المكورة العنقودية الذهبية
Streptococcus pneumoniae	المكورة العقدية الرئوية
Streptococcus pyogenes	المكورة العقدية القيحية
Streptogramins	ستربتوجرامينات
Streptomyces	المتسلسلة
Streptomyces antibiotic regulatory proteins	بروتينات المتسلسلة المنظمة للمضاد الحيوي
Streptomyces antibioticus	المتسلسلة انتيبيوتيكس
Streptomyces calvuligerus	المتسلسلة كافوريجيريس
Streptomyces coelicolor	المتسلسلة كوليكولر
Streptomyces fradiae	المتسلسلة فرادي
Streptomyces lavendulae	المتسلسلة لافينديولي
Streptomyces peucetius	المتسلسلة بيوسيتيس

Streptomyces toyocaensis	المتسلسلة تويوكانسيس
Streptomyces vinezulelae	المتسلسلة فينزويلي
Streptomyces virginiae	المتسلسلة فيرجيني
Streptomyces wedmorensis	المتسلسلة ويندمورينسيس
Streptomycin	ستربتوميسين
Suicide substrates	مواد انتحارية
Sulbactam	سولبكتام
Sulfamethoxazole	سلفاميثوكسازول
Sulfamethoxazole -trimethoprim	سلفاميثوكسازول-ترايميثوبريم
Surfactin	سورفاكتين
Susceptibility testing	إختبار الحساسية
Synercid	سينيرسيد

T

Targets	أهداف
Tazobactam	تازوبكتام
Teichoic acid	حمض التيكويك
Teicoplanin	تيكوبلانين
Telithromycin	تيليثروميسين
TEM lactamases	لكتامازات TEM
Tet proteins	بروتينات Tet
Tetracenomycin	تتراسينوميسين
Tetracycline	تتراسيكلين
Thienamycin	ثيناميسين
Thioesterases	ثيوإستيرازات
Thiopeptides	ثيوبِبْتيدات
Thiostrepton	ثيوستربتون

Tiamulin	تياميولين
Tigilicycline	تيجيليسيكلين
Tobramycin	توبراميسين
TolC protein	بروتين TolC
Topoisomerases	توبوأيزوميرازات
Toxins	سموم (ذيفانات)
Transglycosylases	تسرانسغليكوسيلازات
Translation	ترجمة (إنتساخ)
Transpeptidation	نقل الببتيد
Triclosan	ترايكلوسان
Trimethoprim	ترايميثوبريم
Trimethoprim-sulfamethoxazole	ترايميثوبريم- سلفاميثوكسازول
Tuberculosis	الدرن (السل)
Two-component regulatory systems	الأجهزة (الأنظمة) المنظمة ذات -الشقّيْن
Tyl proteins	بروتينات Tyl
Tylosin	تيلوسين
Tyrocidine	تيروسيدين

U

Undecaprenyl phosphonopantetheinyl synthase	أندي كابرينيل فوسفوبانتيثينيل سينثاز
Undecylprodiogiosin	أنديسيل بروديوجيوسين

V

Valnemulin	فالنيميولين
Van phenotypes	الأنماط الظاهرية Van
Vancomycin	فانكوميسين
Vancomycin resistant enterococci (VRE)	المكورة المعوية المقاومة للفانكوميسين

Var proteins	بروتينات Var
variants	متغيرات
Virginiamycins	فيرجينياميسينات
Virulence factors	عوامل الفوعية
VmsR protein	بروتين VmsR
Vnc proteins	بروتينات Vnc

Y

Yersinia	يرسينيا

Z

Zinc hydrolase	زنك هيدرولازات

كشاف الموضوعات

ب

ش

ط

ع





ل

م

ن



ي

نبذة عن الكتاب

يهتم الكتاب (المضادات الحيوية، طرق العمل، المصادر والمقاومة) بالأصناف الرئيسة الحالية من المضادات الحيوية وفهم طريقة عملها بواسطة تحليل كيفية التدخل الانتقائي لهذه الجزيئات الصغيرة في عملية واحدة أو أكثر من العملية المركزية لبقاء الخلايا البكتيرية، كما أن غالبية التركيز في هذا الكتاب كانت على المنتجات الطبيعية ذات النشاط كالمضاد الحيوي التي تنتجها المكروبات إضافة إلى المواد الكيميائية المُصنعة.

وقد تم تقسيم الكتاب إلى خمسة أبواب :

* **الباب الأول:** تقديم المفاهيم الأولية للمضادات الحيوية.
* **الباب الثاني:** الأهداف المُثبتة والأصناف الرئيسة للمضادات الحيوية وطرق عملها.
* **الباب الثالث:** ركّز على الآليات الرئيسة لمقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا المسببة للأمراض وتشمل المناعة الطبيعية مقابل المناعة المكتسبة والتدمير الإنزيمي وتعديل المضاد الحيوي بواسطة البكتيريا المقاومة، ومضخات الدفق للخارج، واستبدال أو تعديل هدف المضاد الحيوي.
* **الباب الرابع:** اختص بالمنطق الجزيئي للتكوين الحيوي لأنواع المضادات الحيوية المختلفة.
* **الباب الخامس:** اهتم بالإستراتيجيات الجديدة لإيجاد مصادر مضادات حيوية جديدة إضافة [illegible] الحيوية الجديدة المُرجح بروزها إلى الوجود عن طريق الجهود الكيميائية الاصطناعية و[illegible] الاندماجية .



ISBN 9789960559384
ردمك: ...938-4
www.ksu.edu.sa